
BACHELORARBEIT

Frau
Mareike Böhm

**Evaluierung eines Immunassays
basierend auf dem Nachweis
Clostridium difficile spezifischer
Glutamatdehydrogenase und
Vergleich des Assays mit weiteren
diagnostischen mikro- und
molekularbiologischen Methoden.**

Mittweida, 2013

BACHELORARBEIT

**Evaluierung eines Immunassays
basierend auf dem Nachweis
Clostridium difficile spezifischer
Glutamatdehydrogenase und
Vergleich des Assays mit weiteren
diagnostischen mikro- und
molekularbiologischen Methoden.**

Autor:

Frau

Mareike Böhm

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI08w2-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dr.med. Hans-Peter Maidhof

Einreichung:

Mittweida, 30.01.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2013

BACHELORTHESIS

**Evaluation of an immunoassay based
on the detection of *Clostridium
difficile* specific glutamate
dehydrogenase and comparison of the
assay with other diagnostic
microbiological and molecular
biological methods.**

author:

Ms.

Mareike Böhm

course of studies:

Biotechnology/Bioinformatics

seminar group:

BI08w2-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

second examiner:

Dr.med. Hans-Peter Maidhof

submission:

Mittweida, 30.01.2013

defence/ evaluation:

Mittweida, 2013

Bibliographische Beschreibung:

Böhm, Mareike:

Evaluierung eines Immunassays basierend auf dem Nachweis *Clostridium difficile* spezifischer Glutamatdehydrogenase und Vergleich des Assays mit weiteren diagnostischen mikro- und molekularbiologischen Methoden. 2013.

Seitenzahl Verzeichnisse: 19

Seitenzahl des Inhaltes: 71

Seitenzahl der Anhänge: 12

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/
Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Englischer Titel

Evaluation of an immunoassay based on the detection of *Clostridium difficile* specific glutamate dehydrogenase and comparison of the assay with other diagnostic microbiological and molecular biological methods.

Kurzreferat:

Eine schnelle und zuverlässige *C. difficile* Diagnostik ist essentiell für die Einleitung geeigneter Therapiemaßnahmen. Bis heute wurde weltweit keine Standardisierung für die Labordiagnostik festgelegt. Jede Untersuchungseinrichtung muss sich selbst aus der Fülle der auf dem Markt vorhandenen Methoden für einen Algorithmus entscheiden. In der Literatur sind unzählige Vorschläge getesteter Verfahrens-Kombinationen mit ihren Leistungsdaten zu finden. Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden aufgegriffen und miteinander verglichen. In diesem Zug fand auch die Evaluierung eines neuen Testverfahrens statt. Zusätzlich sollte die Diagnostik des mikrobiologischen Laboratoriums der Zentrum für Diagnostik GmbH Chemnitz analysiert und gegebenenfalls verbessert werden.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich als erstes bei meinem Betreuer seitens der Zentrum für Diagnostik GmbH Chemnitz, dem Leiter der mikrobiologischen Abteilung Dr.med. Hans-Peter Maidhof, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und durch interessante Gespräche immer neue Ansatzpunkte und Perspektiven eröffnete.

Ebenso gilt mein Dank meinen Betreuern der Hochschule Mittweida, Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbke Wünschiers und M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) René Kretschmer.

Des Weiteren möchte ich bei der gesamten Belegschaft des mikrobiologischen sowie des molekularbiologischen Labors bedanken, ich wurde sehr herzlich aufgenommen, jederzeit bestens unterstützt und mit allerhand Nervenahrung versorgt.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Sepp Kaul und Dr. rer. medic. Andreia de Albuquerque, die Leitung der molekularbiologischen Abteilung, für das Vertrauen, wertvolle Ratschläge und eine tolle Unterstützung in Bezug auf die Durchführung der PCR-Verfahren.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei der Firma R-Biopharm bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere bei Katrin Hoyer für die Organisation, bei Dr. Carola Döffinger für die Betreuung und Hilfe der statistischen Auswertung, bei Renate Fischer und Diana Martens für Rat und Tat zu jeder Zeit.

Der größte Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, welche mich in jeder Situation motiviert und unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Theoretische Grundlagen..... | 2 |
| 2.1 Clostridien..... | 2 |
| 2.2 <i>Clostridium difficile</i> | 3 |
| 2.3 Pathogenese des Erregers..... | 5 |
| 2.3.1 zellassoziierte Virulenzfaktoren | 5 |
| 2.3.2 Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) | 6 |
| 2.3.3 binäres Toxin (CDT)..... | 9 |
| 2.3.4 Sporenproduktion..... | 10 |
| 2.3.5 Hypervirulente Stämme | 12 |
| 2.4 Epidemiologie und Übertragung..... | 13 |
| 2.4.1 Epidemiologie | 13 |
| 2.4.2 Übertragungsweg | 14 |
| 2.5 Klinische Symptomatik einer <i>C. difficile</i> Infektion | 15 |
| 2.5.1 asymptomatische Kolonisation | 16 |
| 2.5.2 <i>Clostridium difficile</i> Infektion (CDI) | 16 |
| 2.5.3 pseudomembranöse Kolitis (PMC)..... | 17 |
| 2.5.4 toxisches Megakolon | 18 |
| 2.5.5 Rezidiv | 19 |
| 2.5.6 Risikofaktoren..... | 20 |
| 2.6 Diagnostik einer <i>C. difficile</i> Infektion | 20 |
| 2.6.1 mikrobiologischer Nachweis | 21 |
| 2.6.2 molekularbiologischer Nachweis..... | 23 |
| 2.6.3 Diagnostik in Europa | 23 |
| 3 Zielstellung | 25 |
| 4 Material..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Geräte | 26 |
| 4.2 Kits | 27 |
| 4.3 Medien | 29 |
| 4.4 Software | 29 |
| 4.5 Probenmaterial | 29 |
| 4.5.1 Probenmaterial zum der Reproduzierbarkeit | 29 |
| 4.5.2 Probenmaterial zum Test innerhalb der Studie | 30 |
| 5 Methoden | 31 |
| 5.1 Reproduzierbarkeitsstudie für das RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA | 32 |
| 5.2 Probenhandling | 32 |
| 5.3 Kultivierung von <i>C. difficile</i> aus Stuhlproben: 48h/96h | 33 |
| 5.4 Identifizierung von <i>C. difficile</i> Kulturen | 33 |
| 5.5 Immunassay zum Nachweis der Toxine A/B von <i>C. difficile</i> | 34 |
| 5.6 Immunassay zum Nachweis <i>C. difficile</i> spezifischer Glutamatdehydrogenase | 35 |
| 5.7 DNA Extraktion – Isolation <i>C. difficile</i> spezifischer Nukleinsäuren | 36 |
| 5.8 polymerase Kettenreaktion | 39 |
| 6 Ergebnisse | 43 |
| 6.1 Vergleich der diagnostischen Methoden | 43 |
| 6.1.1 Kultureller Nachweis von <i>C. difficile</i> | 44 |
| 6.1.2 ELISA zum Nachweis der Toxine TcdA/TcdB | 45 |
| 6.1.3 ELISA zum Nachweis der <i>C. difficile</i> spezifischen GDH | 48 |
| 6.1.4 real-time PCR | 52 |
| 6.1.5 Alters- und Geschlechterverteilung | 55 |
| 6.2 Evaluierung des Antigen ELISAs | 57 |
| 6.2.1 Reproduzierbarkeitsstudie | 57 |
| 6.2.2 Vergleich des GDH-ELISA mit einem kommerziellen Konkurrenz-ELISA | 57 |
| 6.2.3 Vergleich der Ergebnisse der Pilotchargen 1, 2 und 3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs | 59 |
| 7 Diskussion | 61 |
| 7.1 Vergleich der diagnostischen Methoden | 61 |
| 7.2 Evaluierung des Antigen ELISAs | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 8 Ausblick | 71 |
| Literaturverzeichnis | 72 |
| Anhang..... | 83 |
| Selbstständigkeitserklärung..... | 95 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>C. difficile</i> , Maßstab: 2 µm [Holland and Bannert, Robert Koch-Institut, 2011] | 4 |
| Abbildung 2: TcdA/TcdB Struktur, Prozess der zellulären Intoxikation [Pruitt and Lacy, 2012] | 8 |
| Abbildung 3: binary Toxin CDT, Prozess der zellulären Intoxikation [Haglund and Welch, 2011] | 10 |
| Abbildung 4: Prozess der Sporulation [Cummings, 2006] | 11 |
| Abbildung 5: endoskopische Aufnahme einer pseudomembranösen Kolitis, weißlich-gelbe Plaques (Pseudomembranen) [Younus and Steigbigel, 2004] | 18 |
| Abbildung 6: Röntgenaufnahme des Abdomens: Dilatation des Kolons [Schunter et al., 2007] | 19 |
| Abbildung 7: Überblick der verwendeten diagnostischen Verfahren in Europa im Jahr 2003 [Barbut et al., 2003] | 24 |
| Abbildung 8: Kultur Probe 117, <i>C. difficile</i> Kolonien nach 48 h | 34 |
| Abbildung 9: Aufbau einer Maxwell® 16 Kartusche mit ihren Reaktionslösungen [Promega GmbH, 2011] | 37 |
| Abbildung 10: Aufbau des Maxwell®16 mit beladenem Probenrack | 38 |
| Abbildung 11: gekühlter Aluminiumblock mit Reaktionsgefäßen | 40 |
| Abbildung 12: Kurvenverlauf der Proben 182-188, Quantitation Analysis | 41 |
| Abbildung 13: Kurvenverlauf der internen Amplifikationskontrolle der Proben 182-188 | 42 |
| Abbildung 14: GDH-ELISA (R-Biopharm), Proben 134-142 | 48 |
| Abbildung 15: Altersverteilung der 307 Patienten | 56 |
| Abbildung 16: Geschlechterverteilung im Studienkollektiv (n=307), zusammengesetzt aus 155 Männern und 152 Frauen | 56 |
| Abbildung 17: Kurvenverlauf der Probe 152, Quantitation Analysis | 65 |
| Abbildung 18: graphische Darstellung der Messwert-Verteilung von Referenzlösung 3 | 68 |
| Abbildung 19: graphische Darstellung der Messwert-Verteilung von Referenzlösung 6 | 69 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 20: graphische Darstellung der prozentualen Leistungsdaten beider GDH- ELISA Verfahren | 70 |
|---|----|

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht zum Ansatz der Mastermix-Lösungen [R-Biopharm, 2011]..... | 39 |
| Tabelle 2: real-time PCR Protokoll [R-Biopharm, 2011]..... | 41 |
| Tabelle 3: Ergebnisse 48 h Kultur, Diskrepante | 44 |
| Tabelle 4: Ergebnisse 96 h Kultur, Diskrepante | 45 |
| Tabelle 5: Ergebnisse Toxin-ELISA, Diskrepante | 46 |
| Tabelle 6: negative Ergebnisse der Toxin Nachtestung..... | 46 |
| Tabelle 7: Vergleich des Toxin-ELISAs aus der Stuhlprobe mit der Toxin PCR | 47 |
| Tabelle 8: Vergleich des Toxin-ELISAs (Ergebnisse der Nachtestung einbezogen) mit der Toxin PCR | 47 |
| Tabelle 9: Ergebnisse RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA, Diskrepante | 49 |
| Tabelle 10: Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISAs mit den Referenzen a) Kultur und b) 16S rDNA PCR..... | 50 |
| Tabelle 11: Ergebnisse Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISA, Diskrepante..... | 50 |
| Tabelle 12: Vergleich des Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISAs mit den Referenzen a) Kultur und b) 16S rDNA PCR..... | 51 |
| Tabelle 13: Ergebnisse 16S rDNA PCR, Diskrepante..... | 52 |
| Tabelle 14: Vergleich des 16S rDNA PCR (mit Wdh.) mit der 48 h Kultur..... | 53 |
| Tabelle 15: Ergebnisse Toxin-PCR, Diskrepante | 54 |
| Tabelle 16: Vergleich der Toxin-PCR mit den Referenzen a) Toxin-ELISA aus Stuhlmaterial und b) Toxin-ELISA inc. Der Nachtestungen aus der Kultur | 55 |
| Tabelle 17: Ergebnisse der Intra-/Inter-Assay Reproduzierbarkeit der Pilotcharge 1 | 57 |
| Tabelle 18: Ergebnisse des RIDASCREEN Clostridium difficile GDH-ELISAs im Vergleich mit Referenz a) Kultur und Referenz b) der PCR zum Nachweis der 16S rDNA | 58 |
| Tabelle 19: Ergebnisse des Konkurrenz-ELISAs im Vergleich mit Referenz a) Kultur und Referenz b) der PCR zum Nachweis der 16S rDNA | 58 |
| Tabelle 20: Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs mit einem Konkurrenz-ELISA | 59 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 21: Übersicht der Leistungsdaten der Pilotchargen 1, 2 und 3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs..... | 60 |
| Tabelle 22: Ergebnisse der Proben Nr. 291 und 292, Verdacht auf Kontamination durch Verspritzung auf der Agarplatte | 62 |
| Tabelle 23: Ergebnis der Probe Nr. 43, schleimige Konsistenz, positives Kultur- Ergebnis nach 96 h..... | 62 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------|--|------------|--|
| AAD | Antibiotika-assoziierte Diarrhö | MW | molecular weight |
| ABHR | Alkohol-based hand rubs | NC | Negativkontrolle |
| AG | Antigen | NPV | negative predictive value |
| AK | Antikörper | PaLoc | Pathogenitätslokus |
| AS/AA | Aminosäuren/amino acid | PC | Positivkontrolle |
| CDAD | <i>Clostridium difficile</i> assoziierte Diarrhö | PMC | pseudomembranous colitis |
| CDI | <i>Clostridium difficile</i> Infection | PMPs | paramagnetic particles |
| CPE | zytopathischer Effekt | PPI | proton pump inhibitor |
| CROPs | combined repetitive oligopeptides | PPV | positive predictive value |
| Ct | Cycle Threshold | RKI | Robert Koch Institut |
| Cwp | Cell wall protein | RP | Referenzproben |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | single ORF | single open-reading frame |
| ELISA | Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay | SLP | Surface layer protein, S-layer protein |
| Fbp | fibronectin binding protein | SLT | Shiga-like Toxin |
| FliD | flagellar filament capping protein | TR | Teströhrchen |
| GDH | Glutamatdehydrogenase | VK | Variationskoeffizient |
| GTPasen | Guanosintriphosphatasen | ZfD | Zentrum für Diagnostik |
| HC | hämorrhagische Colitis | | |
| LCT | large clostridial toxin | | |
| LFA | lateral-flow Assay | | |
| MM | Master Mix | | |
| MTP | Mikrotiterplatten | | |

1 Einleitung

C. difficile ist ein weltweit verbreiteter nosokomialer Erreger welcher für große Infektionsausbrüche verantwortlich ist. Immer häufiger wird von schweren Krankheitsverläufen, einer erhöhten Rate auftretender Komplikationen (PMC) und damit verbundener Letalität berichtet. Die erhöhte Umweltresistenz des Erregers erschwert dem Pflegepersonal die Arbeit, herkömmliche Desinfektionsmittel sind gegen die *C. difficile* Sporen unwirksam. Bei diesem Erreger tritt das klassische Händewaschen als wichtige Hygienemaßnahme neben der Hände-Desinfektion wieder in den Vordergrund. Nicht selten berichten auch die Medien über Hygienemängel in Krankenhäusern, welche die Verbreitung nosokomialer Erreger unterstützt [Eckmanns et al., 2001; Blawat, 2010]. Vermutlich mit ursächlich wirken sich der Fachkräftemangel sowie der erhöhte Stellenabbau in den letzten Jahren negativ auf die Pflegestruktur der Krankenhäuser aus [Nikolow, 2007]. Ebenso könnte ein mangelndes Bewusstsein durch fehlende Aufklärung innerhalb der Einrichtungen im Umgang mit *C. difficile* zur Erhöhung der Inzidenz-Zahlen führen. Der Schutz durch Desinfektion beseitigt lediglich die vegetative Form der Erreger. Um schnellst möglich die geeignete Behandlung sowie die notwendigen Hygienemaßnahmen einleiten zu können ist eine schnelle und aussagekräftige *C. difficile* Diagnostik essentiell. Dabei ist die Auswahl an diagnostischen Nachweisverfahren breit gefächert. Eine Standardisierung der *C. difficile* Detektion ist bis heute nicht festgelegt, dafür gibt es weltweit verschiedene Empfehlungen zum Nachweis des Erregers [Robert Koch Institut, 2007; Wren et al., 2009; Cohen et al., 2010]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einigen wichtigen Verfahren die den Laboratorien zur Verfügung stehen. Die erfassten Daten sollen einen Überblick über die spezifische Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden geben und damit bereits vorgeschlagene Test-Algorithmen in ihrer Qualität bestätigen beziehungsweise kritisch beurteilen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Clostridien

Die Gattung der Clostridien gehört zur artenreichen Familie der Clostridiaceae welche sich zum Stamm der Firmicutes ordnen. Bis heute sind über 100 Arten der Gattung *Clostridium* identifiziert, gerade einmal 13 Vertreter besitzen nachweislich ein pathogenes Verhalten gegenüber Mensch oder Tier [Dupuy and Matamouros, 2006]. Das äußere Erscheinungsbild der gram-positiven Bakterien ist durch eine schlanke, gerade bis leicht gebogene Stäbchenform gekennzeichnet. Aufgrund der peritrichen Begeißelung, eine Ausnahme bildet *C. perfringens*, sind die Bakterien beweglich. Als obligate Anaerobier sind Clostridien ubiquitär verbreitet. Vornehmlich sind die Bakterien im anoxischen Milieu des Bodens zu finden, zum Teil kommen sie dort als aerotolerante Arten in Form von Saprophyten vor. Auch in Gewässern, Lebensmitteln und im Intestinaltrakt von Säugetieren treten verschiedene Spezies in Erscheinung. Mit Hilfe der Fähigkeit der Endosporenbildung aus den vegetativen Zellen sind die Bakterien jedoch sehr widerstandsfähig gegen Hitze, Trockenheit, aerobe Bedingungen und verschiedene Chemikalien (Desinfektionsmittel). So gibt es mesophile, thermophile (60 – 75 °C) und psychrophile Formen. Infolge des fehlenden Cytochromsystems besitzen die Clostridien keine Atmungskette, die ATP-Synthese erfolgt über eine Stufensubstratphosphorylierung. Daraus ergibt sich eine Vielfalt verschiedener Gärungsreaktionen welche die Einteilung in fermentative Gruppen erforderlich machen: saccharolytische *C.* (Kohlenhydrat-Fermenter), proteolytische *C.* (Aminosäure-Fermenter) sowie Purin-, Harnsäure- und Ethanol-Verwerter [Munk 2008]. Clostridien sind in der Lage größere Mengen an Toxinen zu produzieren als jede andere Gattung sowie jede andere Art pathogener Bakterien, zusätzlich produzieren sie das wirkungsvollste Gift in der Natur, das Botulinum Neurotoxin [Johnson, 1999]. Dringen die Bakterien über Verletzungen der Hautoberfläche in das Gewebe ein, können invasive Infektionen oder Gasbrand entstehen. Gelangen die Erreger mit der Nahrungsaufnahme in den Körper, kann es zu schweren Vergiftungen und entzündlichen Prozessen kommen. Vertreter sind beispielsweise *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordellii* und *C. septicum* als Gasbrand-Erreger, *C. tetani* als Tetanus-Erreger

(Wundstarrkrampf), *C. botulinum* als Verursacher gefährlicher Lebensmittelintoxikationen sowie *C. difficile* als Auslöser intestinaler Infektionen. Nicht alle Arten der Clostridien sind pathogen wirksam, einige Vertreter gehören zur Standortflora des Intestinaltrakts von Säugetieren.

2.2 *Clostridium difficile*

Erstmals entdeckt wurde das Bakterium 1935 durch Hall und O'Tool bei Untersuchungen der Normalflora aus Stuhlproben gesunder Neugeborener [Hall and O'Tool, 1935]. Seinen Artnamen erhielt das Bakterium aufgrund der unter damaligen Umständen schwierigen anaeroben Kultivierung und Isolation, *Bacillus difficilis* (lat. = schwierig). *C. difficile* ist ein Gram-positives, sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium, dessen Größe zwischen 3-16,9 x 0,5-1,9 µm variieren kann, es ordnet sich der Gattung Clostridium unter [Hatheway, 1990]. Die Abbildung 1 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Stäbchen, das keulenförmige Äußere einiger Bakterien deutet auf die Ausbildung von Endosporen hin. Einige Stämme des Bakteriums sind mit Fimbrien und Flagellen ausgestattet, was *C. difficile* die Adhäsion an Festkörpern sowie die Fortbewegung in Flüssigmedien ermöglicht [Hurley and Nguyen, 2002; Borriello 1998]. Die Fähigkeit zur subterminal gelegenen Endosporenbildung verleiht dem Bakterium eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen wie Hitze und Austrocknung sowie einer Reihe chemischer Substanzen, darunter auch einigen Desinfektionsmitteln [Health Protection Agency, 2006]. Als obligater Anaerobier ist *C. difficile* ubiquitär verbreitet, der Organismus ist in verschiedenen Umweltproben (Erdboden, Gewässer), Lebensmitteln (Fleisch, Gemüse) sowie im Intestinaltrakt von Mensch und Tier nachweisbar [Saif and Brazier, 1996; Harvey et al., 2011]. Häufig wird das Bakterium in Stuhlproben von Neugeborenen und Kleinkindern detektiert (bis 80%), wesentlich seltener ($\leq 5\%$) ist der Erreger bei asymptomatischen Erwachsenen zu finden. Charakteristisch für *C. difficile* ist außerdem die Produktion von para-Kresol aus dem Fermentationsprozess von Tyrosin. Der intensive Geruch der aromatischen Verbindung erinnert an „Pferdestall“ und fungiert als dienlicher Hinweis bei der Identifizierung eines kulturellen Ansatzes [Jones, 1989; Dawson et al., 2011]. Das Bakterium generiert die

benötigte Energie mit Hilfe der Stufensubstratphosphorylierung. *C. difficile* ist in der Lage Monosaccharide wie Fructose, Glucose, Mannose, Mannitol und Xylose zu fermentieren, es wird der saccharolytischen Gruppe zugeordnet [Hatheway, 1990]. Ende der 70er Jahre wurde *C. difficile* als Auslöser der pseudomembranösen Kolitis sowie der milder verlaufenden antibiotika-assoziierten Diarrhö identifiziert [Bartlett et al., 1978]. Pathogene Stämme sind in der Lage verschiedene Virulenzfaktoren auszubilden, die wichtigsten darunter sind zwei Exotoxine, das Enterotoxin A und das Zytotoxin B. Folgen einer Infektion mit einem pathogenen Stamm können zytotoxische Schädigungen der Intestinalzellen sein, welche milde bis schwere Verläufe einer Diarrhö bis hin zu einer pseudomembranösen Kolitis nach sich ziehen [Kelly and LaMont, 1998]. Einige pathogene Stämme exprimieren zusätzlich ein weiteres binäres Toxin dessen Beitrag zur Pathogenese bislang noch nicht eindeutig geklärt ist. Weltweit wird *C. difficile* zu den häufigsten nosokomialen Erregern gezählt. Studien haben gezeigt, dass es aufgrund einer erhöhten Prävalenz in Krankenhäusern schnell zu einem Anstieg der Besiedelung (20-40 %) mit dem Bakterium kommt. Der Großteil der Patienten bleibt jedoch asymptomatisch [Barlett, 2006; Reichardt et al., 2007]. Desweiteren wird eine *C. difficile* Infektion (CDI) in vielen Fällen mit der Einnahme von Antibiotika assoziiert. Das physiologische Gleichgewicht der Standortflora des Intestinaltrakts wird durch eine Antibiotika Therapie empfindlich gestört, sodass die resistenten Erreger entstandene anaerobe Nischen im Kolon leicht besiedeln können. Neben den pathogenen Stämmen gibt es auch apathogene Stämme welche keine Toxine produzieren und folglich keine krankheitsauslösenden Faktoren besitzen [Mylonakis et al., 2001].

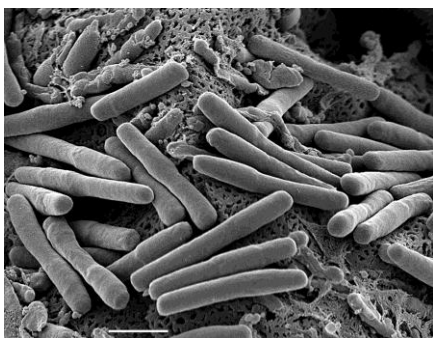


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *C. difficile*, Maßstab: 2 μm [Holland and Bannert, Robert Koch-Institut, 2011]

2.3 Pathogenese des Erregers

Pathogene *C. difficile* Stämme spielen neben dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) eine zunehmend große Rolle als nosokomialer Keim in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen. Aufgrund der Ausbildung verschiedener Virulenzfaktoren variieren die Stämme in ihrer Pathogenität.

2.3.1 zellassozierte Virulenzfaktoren

C. difficile produziert verschiedene zellassozierte Virulenzfaktoren, welche dem Bakterium eine erfolgreiche Ansiedelung an der Darmwand erleichtern. Einige Stämme sind mit Flagellen ausgestattet, dessen eindeutige Rolle bei der Kolonisation des Darms noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird berichtet, dass das cap-Protein FliD sowie das flagellin-Protein FliC bei der initialen Bindung der Flagellen an spezifische Zell- oder Mucin-Rezeptoren involviert ist [Tasteyre et al., 2001a; 2001b]. Versuche mit Mäusen zeigen, dass die Adhäsion von flagellierten *C. difficile* Stämmen 10-mal stärker ist als bei nicht-flagellierten Stämmen der gleichen Serogruppe, was die Beteiligung der Flagellen an einer Kolonisation des Intestinaltrakts bestätigt [Tasteyre et al., 2001b]. Einige Stämme sind auch in der Lage kapselartige Strukturen zu entwickeln. Inwiefern die Eigenschaft der Kapselbildung mit der Adhäsion der Bakterien an der Darmwand zusammenhängt ist bislang nicht bewiesen [Baldassarri et al., 1991]. Jedoch belegt eine Studie von Davies und Borriello den Schutz des gekapselten Bakteriums vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus [Davies and Borriello, 1990]. Auch die Oberflächenproteine (SLPs) von *C. difficile* tragen zur Kolonisation der Mukosa sowie zu folgenden Entzündungsprozessen bei [Calabi et al., 2002]. Neben den SLPs gibt es weitere Faktoren, die eine Rolle im Adhäsionsprozess des Bakteriums spielen. Wichtig zu nennen ist das Fibronektin-bindende Protein Fbp68 [Barketi-Klai et al., 2011; Hennequin et al., 2003] sowie die Zellwand-Proteine Cwp66 und Cwp48 [Péchiné et al., 2005]. Die Bedeutung der S-layer Proteine P36 und P47 von *C. difficile* wurde in einigen Studien untersucht, wobei bei dem lower-molecular-mass (lower-MW) S-layer Protein P36 adhäsive Eigenschaften nachgewiesen wurden

[Karjalainen et al., 2002; Mauri et al., 1999]. Als weitere potentielle Adhäsine werden das zur Familie der Hsp60 zugehörige GroEL-Protein und spezifische proteolytische Enzyme diskutiert [Poilane et al., 1998; Hennequin et al., 2001].

2.3.2 Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB)

Die wirkungsvollsten Virulenzfaktoren von pathogenen *C. difficile* Stämmen sind die Exotoxine A (TcdA) und B (TcdB). Als krankheitsauslösende Faktoren verursachen sie zytotoxische Schäden der intestinalen Zellstruktur, Diarrhö oder Kolitis sind die Folgen. Erstmalig beschrieb Green 1974 ein Zytotoxin bei Untersuchungen der Fäkalien von Guinea-Schweinen nach der Gabe von Penicillin [Green, 1974]. Unabhängig davon fand Tedesco im selben Jahr einen Zusammenhang zwischen der Clindamycin-Therapie und der Entwicklung einer pseudomembranösen Kolitis [Tedesco et al., 1974]. Zur selben Zeit beendete auch Hafiz seine Doktorarbeit zum Thema „Clostridium difficile and its Toxins“ [Hafiz, 1974]. Diese Studien setzten den Grundstein zur Erforschung von *C. difficile* als Auslöser der antibiotika-assoziierten Diarrhö 1977 [Bartlett et al., 1978]. Taylor gelang 1981 die Isolation beider Toxine aus dem Kulturüberstand, die Erstbeschreibung zu Toxin A folgte, das Zytotoxin B wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben [Taylor et al., 1981].

TcdA und TcdB gehören zur Familie der „large clostridial toxins“ (LCTs) zu denen sich auch die letal/hämorrhagischen Toxine von *C. sordellii* (TcsL/TcsH) sowie das α -Toxin von *C. novyi* (Tcn α) ordnen [Just and Gerhard, 2004; Schirmer and Aktories, 2004]. Für LCTs spezifisch, weisen beide Toxine ein hohes molekulares Gewicht auf, Toxin A 308 kDa, Toxin B 270 kDa. Damit sind die *C. difficile* Toxine A und B die derzeit größten bekannten bakteriellen Toxine [von Eichel-Streiber et al., 1991; Just et al., 1995; Ackermann, 2004]. Abhängig von Variationen in beiden Toxingenen lassen sich die *C. difficile* Stämme in 24 Toxintypen einteilen [Pituch et al., 2005; Geric et al., 2004; Rupnik et al., 2003]. Einzeln betrachtet wird TcdB als Zytotoxin beschrieben, auch TcdA weist zytotoxische Aktivitäten auf, jedoch ist TcdB im Vergleich um ein Vielfaches potenter. TcdA wird eindeutig als Enterotoxin charakterisiert, auch aktuelle Studien weisen TcdA als Auslöser einer *Clostridium*

difficile Infektion (CDI) nach [Kelly et al., 1994; Kuehne et al., 2010]. In einer Studie aus dem Jahr 2003 wurde TcdB ebenfalls als Enterotoxin diskutiert, Lyras beschrieb 2009 das Toxin B als essentiellen Faktor für die Virulenz von *C. difficile* [Savidge et al., 2003; Lyras et al., 2009]. Der Diskussionsbedarf bezogen auf die pathogenen Stämme, welche beide Toxine (A+/B+) oder nur Toxin B (A-/B+) exprimieren ist allgegenwärtig. Genetisch sind die Toxine TcdA und TcdB, beides Glucosyltransferasen, nah verwandt, es wurde eine Identität von 49% sowie eine Ähnlichkeit von 63% nachgewiesen [Pruitt and Lacy, 2012]. Anhand des strukturellen Aufbaus ist die Zugehörigkeit zur Klasse der A/B-Toxine beschrieben. Subunit B (C-Terminus) bildet den „bindenden Teil“ des Toxins und sorgt für die Zusammenkunft zwischen Toxin und Rezeptorprotein auf der Oberfläche des Wirtsorganismus sowie der Aufnahme des Toxins mittels Endozytose ins Zytosol. Aufgebaut ist die Subunit B aus 3 Domänen, einer Autoprotease-Domäne, der delivery/poreforming-Domäne sowie der Rezeptor-binding-Domäne (CROPs). Subunit A (N-Terminus) ist die aktive Enzymdomäne des Toxins, nach Prozessierung und Membrantranslokation der Subunit A aus dem Endosom erfolgt die Glucosylierung von Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42). In Folge dessen kommt es zur Desintegration der „Tight-Junctions“ und damit zur Auflösung von mitochondrialen Membranen, die Funktion des Aktinzytoskeletts ist empfindlich gestört. Kodiert sind die Gene *tcdA* und *tcdB* in „single-open-reading frames“ (single ORF), welche auf einem Pathogenitätslocus (PaLoc) der Länge 19,6 kb lokalisiert sind [Voth and Ballard, 2005]. In erster Linie verursachen TcdA und TcdB eine Störung der Zellstruktur im Kolon. Dabei werden die „Tight Junctions“ beeinträchtigt, die Barrierefunktion ist nicht mehr wirksam. Beide Toxine bewirken ein Abrunden der Zellen, das Zytoskelett des Darmgewebes wird zerstört. TcdB wirkt dabei 100 - 10.000 mal potenter als TcdA. Folglich kommt es zu Entzündungen des Kolons sowie vermehrter Flüssigkeitssekretion aufgrund erhöhter Permeabilität des Gewebes [Pruitt and Lacy, 2012; Nusrat et al., 2001; Pothoulakis, 2000]. Pathogene *C. difficile* Stämme sind in der Lage Toxin A und B zu produzieren oder nur Toxin B. Können beide Toxine gemeinsam wirken bietet die durch TcdA verursachte Schädigung von Mukosa und Epithelzellen einen Vorteil für TcdB, die Schädigung erleichtert das Eindringen in tieferliegende Zellschichten [Ackermann, 2004a].

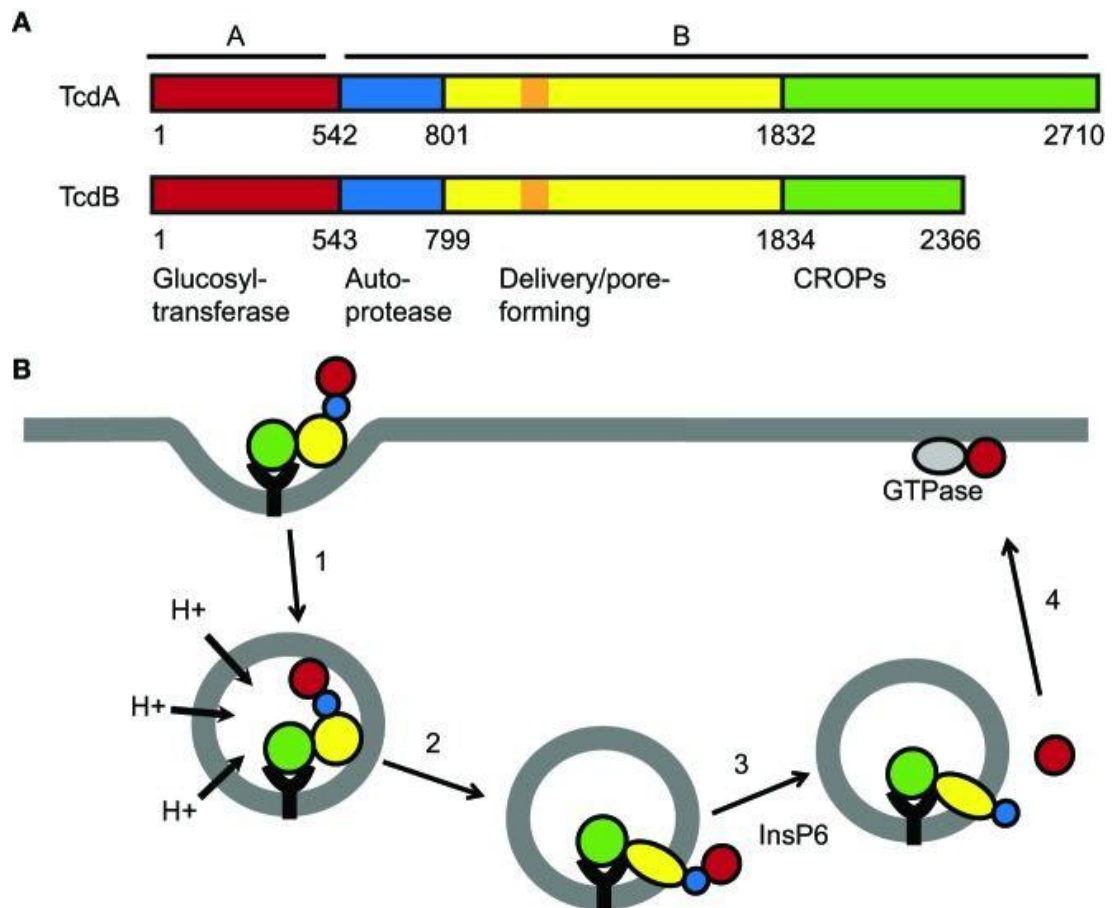


Abbildung 2: TcdA/TcdB Struktur, Prozess der zellulären Intoxikation [Pruitt and Lacy, 2012]

(A) Struktur der homologen Toxine TcdA und TcdB: Beide A/B Toxine besitzen die gleiche Aufteilung von vier Domänen innerhalb der subunit A beziehungsweise der subunit B. Subunit B bildet den C-Terminus, den bindenden Teil der Gucosyltransferase, er ist aufgebaut aus folgenden Domänen: combined repetitive oligopeptides (CROPs), „delivery/pore-forming“ und der Autoprotease-Domäne. Innerhalb der „pore-forming“-Domain ist eine hydrophobe Region lokalisiert, welche wahrscheinlich am Vorgang der Membrantranslokation beteiligt ist. Subunit A, der N-Terminus des Toxins stellt den enzymatischen Teil dar, er besteht einzig aus der Glukosyltranferase-Domäne. (B) Vorgang der zellulären Intoxikation in vier Schritten: 1) Der C-Terminus, welcher mit „sich wiederholenden Oligopeptid-Einheiten“ (CROPs) aufgebaut ist, bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche des Wirtsorganismus. Anschließend folgt die Rezeptor-vermittelte Endozytose und damit die Aufnahme des Toxins innerhalb eines Endosoms ins Zytosol. 2) Zur Vorbereitung auf die Membrantranslokation kommt es mit Hilfe der „delivery/pore-forming“ Domäne zur Bildung einer Pore im Endosom. 3) Es folgt die Prozessierung der aktiven subunit A und dessen Translokation über die Pore ins Zytosol. 4) Die aktive Enzymdomäne beginnt mit der Glucosylierung kleiner GTPasen der Rho-Familie an der Zellmembran [Pruitt and Lacy, 2012].

2.3.3 binäres Toxin (CDT)

Neben der Produktion der Toxine TcdA und TcdB sind einige *C. difficile* Stämme, insbesondere der hypervirulente Stamm CD196/PCR Ribotyp 027, in der Lage ein zusätzliches binäres Toxin (CDT) zu exprimieren. Entdeckt wurde CDT 1988 bei Untersuchungen möglicher ADP-ribosyltransferase Aktivitäten in Kulturüberständen verschiedener Clostridium Spezies von Popoff [Popoff et al., 1988]. In Struktur und Aktivität ähnelt die ADP-Ribosyltransferase dem τ -Toxin (iota) von *C. perfringens*. Das binäre Toxin besteht aus zwei Proteinkomponenten, cdtA (48 kDa) ist die enzymatische Komponente und cdtB (94 kDa) die Rezeptor-Bindungs Komponente, welche außerhalb des PaLoc, im CDT Locus lokalisiert sind [Geric et al., 2004; Perelle et al., 1997]. Nachgewiesen werden konnte das binäre Toxin bisher in TcdA/TcdB positiven Stämmen beziehungsweise in TcdA/TcdB negativen Stämmen [Stubbs et al., 2000; Geric et al., 2006]. Auffällig, im Zusammenhang mit der Produktion des binären Toxins, ist das Auftreten von Polymorphismen in der PaLoc-Region der untersuchten Stämme [Geric et al., 2004]. Bei *C. difficile* Stämmen ohne Veränderungen der Toxingene tcdA und tcdB, vergleichbar mit dem Referenzstamm VPI 10463, trat keine zusätzliche Produktion des Toxins CDT auf [Stubbs et al., 2000]. In Abbildung 3 ist der Prozess der zellulären Intoxikation als Folge der CDT Produktion abgebildet. Das binäre Toxin ribosyliert das Zytoskelettprotein G-Aktin an Arginin-177, folglich kommt es zu einer Inhibierung der Aktin-Polymerisation [Gülke et al., 2001]. Forschungsergebnisse aus dem Jahr 2009 beschreiben die Folgen der Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszellen. Aufgrund der Depolymerisation kommt es zur Bildung „langer Fortsätze“ (ca. 5-150 μ m), bestehend aus Mikrotubuli, welche ein dichtes Netzwerk auf den Oberflächen der Zielzellen bilden. Diese Oberflächenerweiterung gestaltet sich positiv in Hinblick auf die Kolonisation und Adhäsion der Pathogene [Schwan et al., 2009; Schwan et al., 2011].

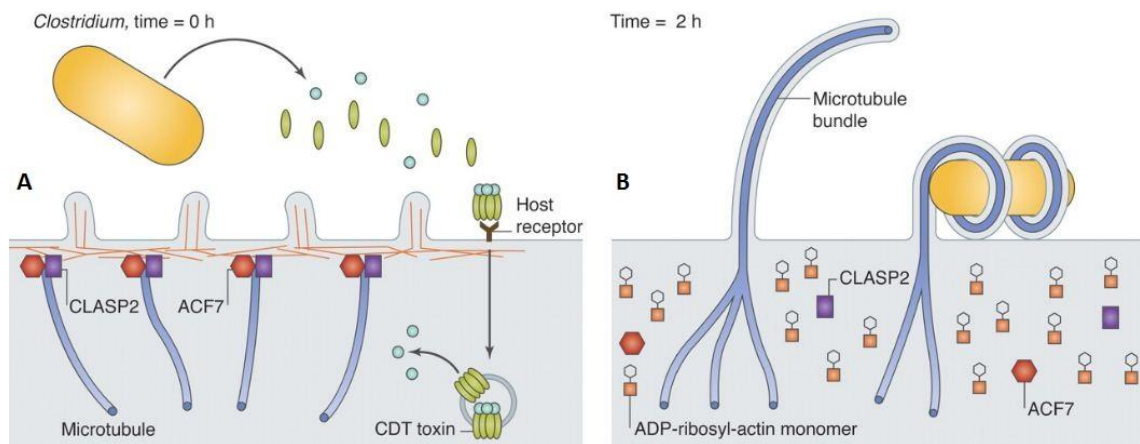


Abbildung 3: binary Toxin CDT, Prozess der zellulären Intoxikation [Haglund and Welch, 2011]

(A) *C. difficile* transferase (CDT): Das binäre Toxin CDT gelangt mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose über das Endosom ins Zytosol der Zielzelle. Die enzymatische Komponente wird nach Prozessierung per Membrantranslokation ins Zytosol entlassen. In erster Instanz kommt es zur ADP-ribosylierung der Aktin-Bausteine, Folgen sind die Rückbildung der Aktin-Filamente, damit auch die Rückbildung der Mikrovilli sowie das Freisetzen der Hüllenproteine (CLASP2/ACF7) welche die Aufgabe der Fassung und Stabilisation der Mikrotubuli nicht mehr übernehmen können. (B) Die Mikrotubuli-Strukturen können nun ungehindert wachsen zelluläre Erweiterungen ausbilden. Aufgrund der neu geschaffenen Oberflächenstruktur können Bakterien aus dem umgebenden Medium stabiler an der Zielzelle haften [Haglund and Welch, 2011].

2.3.4 Sporenproduktion

Um sich vor jeglichen Umwelteinflüssen zu schützen, besitzt *C. difficile* die Fähigkeit hochresistente Endosporen zu entwickeln. Dieser Schutzmechanismus bietet dem pathogenen Organismus eine optimale und sehr effektive Verbreitungs- und Überlebensgrundlage in der Umwelt sowie dem Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier. Anhand verschiedener Tests wurde eine hohe Widerstandsfähigkeit der Sporen gegenüber Hitze, UV-Strahlung, verschiedenen Desinfektionsmitteln sowie Antibiotika nachgewiesen [Sorg and Sonenshein, 2008; Wheeldon et al., 2008; Fawley et al., 2007]. Studien berichten von einer Lebenszeit der aerotoleranten Sporen im aeroben Milieu von über fünf Monaten [Kim et al., 1981]. Der nosokomiale Charakter der *C. difficile* Bakterien steht in direktem Zusammenhang mit der Resistenz der Überdauerungsform. Sporen toxischer Stämme wurden bereits auf Oberflächen, Händen und in Fekalproben von asymptomatischen Krankenhausmitarbeitern nachgewiesen und werden über diese Wege leicht in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen verteilt

[Underwood et al., 2009; Kim et al., 1981; Fekety et al., 1981]. Zur Sporenbildung kommt es nur dann, wenn die Bakterien ungeeigneten Bedingungen ausgesetzt sind, so zum Beispiel Nährstoffmangel oder einer Antibiotika Therapie [Sorg and Sonenshein, 2008]. Unter den genannten Voraussetzungen wird eine Spore innerhalb der Mutterzelle geformt, der Prozess der Sporenbildung ist in Abbildung 4 dargestellt. Erst unter optimalen Bedingungen wird die Spore wieder zum Keimen angeregt. Spezielle Gallen-Salze des Menschen werden in der Literatur häufig als positiver Faktor in Bezug auf die Keimung der *C. difficile* Sporen beschrieben [Wilson, 1983]. Ausschließlich innerhalb der vegetativen Zustandsform ist das Bakterium in der Lage Toxine zu bilden [Sarker and Paredes-Sabja, 2012].

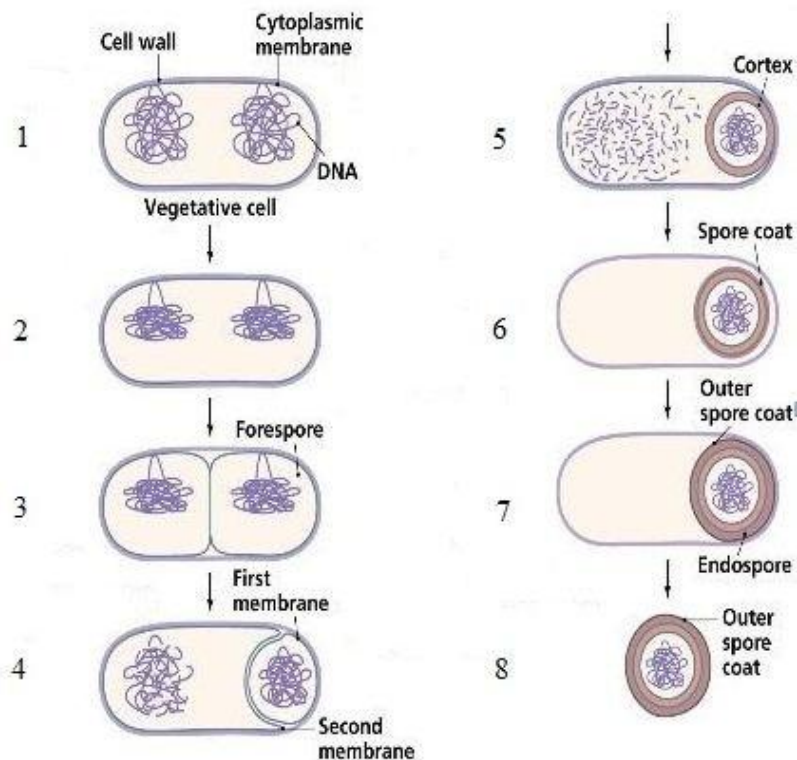


Abbildung 4: Prozess der Sporulation [Cummings, 2006]

(1) vegetative Form: In Vorbereitung auf eine Zellteilung repliziert die Zelle ihre DNA. (2) Die Genophore, die Produkte der Replikation, richten sich entlang der Zellachse aus. (3) Es folgt eine asymmetrische Einschnürung der Zytoplasmamembran (inäquale Zellteilung). (4) Die Ausbildung der Zellwand findet nicht statt, die Cytoplasmamembran der Mutterzelle umhüllt die Tochterzelle (Forespore). (5) Der Cortex, die Sporenrinde wird synthetisiert, sie besteht aus Peptidoglycan. Dieser Prozess geht mit einer Dehydrierung einher. (6) Anschließend bildet die Mutterzelle eine innere Sporenhülle (spore coat) aus. (7) Die äußere Sporenhülle (outer spore coat) bildet den Abschluss der Endospore. (8) Mithilfe der Autolyse der Mutterzelle wird die fertige Spore freigesetzt. [Cummings, 2006; Fuchs and Schlegel, 2006]

2.3.5 Hypervirulente Stämme

Rückblickend auf die letzten 12 Jahre lässt sich weltweit eine Zunahme schwerer *C. difficile* Infektionen beobachten. Als Auslöser dieses Anstiegs werden meist hypervirulente Stämme genannt, welche sich besonders durch schwere klinische Verläufe, eine hohe Rezidivrate sowie schlechtes Ansprechen auf Antibiotika charakterisieren lassen [Reichardt et al., 2007a; Dallal et al., 2002]. Im Jahr 2001 ereignete sich der erste Ausbruch in der Universitätsklinik in Pittsburgh, USA. Der PCR Ribotyp 027, auch als nordamerikanischer Pulsotyp1 (NAP-1/PFGE-Typ 1) oder Restriktionsendonuklease Gruppe-Typ BI (REA Gruppe BI) des Toxinotyp III bekannt wurde als Verursacher dieses Ausbruchs und weiterer Ausbrüche in Nordamerika und 16 europäischen Ländern identifiziert [McDonald et al., 2005; Reichardt et al., 2007a; Kuijper et al., 2008]. Im März 2003 ereignete sich der bisher schlimmste Ausbruch in der kanadischen Provinz Quebec, über 1700 Patienten aus 12 Krankenhäusern waren betroffen. Aufgrund einer diagnostizierten CDI starben 117 Menschen, bei über 80 % der Isolate wurden der Ribotyp 027 nachgewiesen [Loo et al., 2005]. Vertreter des Ribotyps 027 weisen eine erhöhte Virulenz auf, welche auf besondere Eigenschaften zurückzuführen ist. Zusätzlich zu den *C. difficile* Toxinen TcdA und TcdB produziert dieser Ribotyp das binäre Toxin CDT. Anhand dieser Eigenschaften, der Produktion der 3 Toxine, beschrieb Popoff erstmalig 1988 den *C. difficile* Stamm CD196, den PCR-Ribotyp 027 [Popoff et al., 1988]. Als weiterer Grund für eine gesteigerte Virulenz ist eine auffällig erhöhte *in vitro* Expression der Toxine TcdA (16-fach erhöht) und TcdB (23-fach erhöht) im Gegensatz zu den herkömmlichen toxischen *C. difficile* Stämmen des Toxinotyp 0. Den Grund dafür vermutete Warny in einer 18-bp Deletion des Gens *tcdC*, welches als negativer Regulator für beide Toxine fungiert [Warny et al., 2005]. Zusätzlich zu der 18-bp Deletion wurde eine „Nonsense“-Mutation (Einzelnukleotiddeletion) an der Stelle 117 des Gens *tcdC* entdeckt, welche eine Leseraterverschiebung und die Einführung eines Stoppkodons an Position 196 zur Folge hat. Daraus resultiert eine starke Verkürzung des Repressors von 232 auf 65 Aminosäuren (AS) [MacCannell et al., 2006; Warny et al., 2005]. Des Weiteren zeigen Vertreter des Ribotyps 027 eine Multiresistenz gegenüber einer Reihe verschiedener Breitbandantibiotika wie Fluorchinolonen, Cephalosporinen der dritten Generation und

Makroliden [Razavi et al., 2007]. Untersuchungen zu einer gesteigerten Sporenproduktion sowie einer erhöhten Adhärenz zu Epithelzellen des humanen Intestinaltrakts liefern noch keine eindeutigen Ergebnisse [O'Connor et al., 2009; Åkerlund et al., 2008].

Die weltweit höchste Prävalenz der hypervirulenten Stämme ist dem Ribotyp 027 zuzuordnen, jedoch treten in den letzten Jahren auch weitere hypervirulente Stämme in Erscheinung. Vergleichbar mit dem Ribotyp 027 besitzt der Ribotyp 078 die Fähigkeit die Toxine TcdA und TcdB zu produzieren, ebenso das binäre Toxin CDT. Des Weiteren liegt eine 39-bp Deletion des Regulator-Gens *tcdC* sowie eine Punktmutation an der Position 184 vor. Betroffen sind meist jüngere Generationen, <50 [Dawson et al., 2009; Goorhuis et al., 2008]. Eine weitere Gruppe klinisch relevanter Stämme wird als Ribotyp 017 bezeichnet, Vertreter dieses Ribotyps sind durch eine Antibiotika-Resistenz gegen Clindamycin und Fluoroquinolone sowie eine 1,7 kb Deletion im Toxingen *tcdA* gekennzeichnet, die Folge ist ein vorzeitiges Stop-Codon. Das Toxin TcdA wird nicht exprimiert, einzig das Toxin B wird produziert. Gene für das binäre Toxin CDT sind nicht vorhanden [Dawson et al., 2009; Von Eichel-Streiber et al., 2011].

2.4 Epidemiologie und Übertragung

2.4.1 Epidemiologie

Clostridium difficile ist der häufigste Verursacher nosokomialer Diarrhö weltweit, besonders in den Entwicklungsländern stellt der Erreger eine große Gefahr dar. Aus jüngsten Daten, ermittelt von 28 Krankenhäusern im Süden der USA, geht hervor, dass *C. difficile* den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in seiner Rolle als wichtigster nosokomialer Erreger ablöst [Lessa et al., 2012]. Abhängig von der Altersgruppe sind ca. 3 % der Erwachsenen asymptomatisch mit dem Erreger kolonisiert, bei Kleinkindern und Neugeborenen liegt der Wert bei bis zu 70 % [Bartlett, 1994]. In Krankenhäusern sind 15-35 % der Patienten ebenfalls asymptomatisch

besiedelt, jedoch kann es schnell zu einer Entwicklung von Symptomen und damit zu einer Infektion kommen. Im Rahmen einer Antibiotika-Therapie kommt es in 15-25 % der Fälle zu einer Antibiotika-assoziierten-Diarrhö (AAD) durch *C. difficile*, aufgrund ihrer Resistenz vermehren sich die Erreger explosionsartig im Darmtrakt und beginnen mit der Produktion der Toxine TcdA und TcdB [Barbut and Petit, 2001; Schwegmann, 2008]. Seit 2003 lässt sich ein Anstieg der CDI in Nordamerika und Europa beobachten. Diese Entwicklung steht im unter anderem im Zusammenhang mit der Einführung neuer Antibiotika welche die CDI fördern sowie der Verbreitung neuer hypervirulenter Stämme [Owens et al., 2008]. In erster Linie ist der Ribotyp 027 zu nennen welcher erstmals 2003 in Kanada bei einem Ausbruch isoliert wurde. Vier Jahre später wurde der aggressive Erreger erstmalig in Europa (Trier) identifiziert. Vertreter des Ribotyps 027 weisen eine vermehrte Produktion der Toxine TcdA und TcdB auf und sind in der Lage das binäre Toxin CDT zu exprimieren. In Folge dessen besitzen diese Stämme eine höhere Virulenz und Letalität [Lessa et al., 2012; Razavi et al., 2007; Cecil, 2012]. Aufgrund der raschen Entwicklung der *C. difficile* Epidemiologie gewann die internationale Kommunikation zu Ausbrüchen, Inzidenz-Zahlen und neuen Ribotypen schnell an Bedeutung. In Europa wurde 2001 die Gruppe „the European Study Group for *Clostridium difficile* (ESGCD)“ ins Leben gerufen. Diese, sowie weitere Gruppen weltweit, beobachten und berichten über die Entwicklung der Epidemiologie, erforschen neue Ribotypen und testen diagnostische Methoden. Damit übernehmen sie die wichtige Aufgabe der Dokumentation und der Datensammlung für die Gegenwart und die Zukunft [„ESCMID: ESGCD“, 2012].

2.4.2 Übertragungsweg

Ausgeschieden wird der Erreger vom Mensch über den Stuhl. Einer der möglichen Übertragungswege ist die direkte, fäkal-orale Übertragung. Des Weiteren ist der Weg einer indirekten Übertragung über Oberflächen, Krankenhaus-/Pflegepersonal oder Gegenstände (Toiletten, Steckbecken, Bett, Telefon, Stethoskop, etc.) möglich [Kim et al., 1981]. Neben der vegetativen Form von *C. difficile*, welche unter aeroben Bedingungen eine kurze Lebensdauer von einigen Minuten aufweist, gibt es eine zweite, sehr resistente Zustandsform, die Endosporen. Die Bildung von Sporen sichert

dem Erreger eine optimale Verteilung in der Umwelt sowie in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen. Neben den, unter Punkt 2.3.4 bereits beschriebenen Resistenzeigenschaften ist die Unempfindlichkeit gegenüber Umgebungen mit geringen pH-Wert ein weiterer Vorteil, die Sporen können so ungehindert den Magen trakt passieren um anschließend die toxische, vegetative Form zu entwickeln. Ein besonderes Merkmal ist ebenfalls die Unempfindlichkeit gegenüber Alkohol-based hand rubs (ABHRs), welche gegen andere bakterielle Erreger sehr wirksam zum Einsatz kommen [Kaier et al., 2009; Jabbar et al., 2010]. Genannte Eigenschaften ordnen *C. difficile* zu den hoch infektiösen, nosokomialen Erregern, die Übertragung wird durch mangelnde Hygiene stark begünstigt. Nachweislich sind die Bakterien in 20 – 49 % der Fälle in der Umgebung eines Patienten mit einer diagnostizierten CDI zu finden. Nicht zu unterschätzen sind jedoch auch die asymptomatischen Träger des Erregers, Studien belegen eine Kontamination der Umgebung in bis zu 29 % der Fälle [Kim et al., 1981; McFarland et al., 1989].

2.5 Klinische Symptomatik einer *C. difficile* Infektion

Derzeit gibt es weltweit über 150 verschiedene *C. difficile* Stämme welche sich hinsichtlich der Ausbildung verschiedener Virulenzfaktoren unterscheiden. Anhand der Variabilität der PaLoc-Region lassen sich die Stämme in 31 verschiedene Toxinotypen einteilen. Dabei spielen die Eigenschaften der wichtigsten Virulenzfaktoren, den Toxinen (TcdA, TcdB und CDT), dessen Menge, Virulenzwirkung und Kombination eine tragende Rolle [Rupnik, 2010; Elliott et al., 2011]. Bei einer Infektion mit dem Erreger kommt es abhängig vom Stamm und der Situation des Patienten (Alter, Antibiotika Therapie, gesundheitliche Vorgeschichte, Immunstatus, etc.) zur Ausbildung unterschiedlicher Krankheitsbilder.

2.5.1 asymptomatische Kolonisation

Ist ein Mensch Träger der *C. difficile* Bakterien, zeigt jedoch keinerlei Symptome welche zu einem der typischen Krankheitsbilder einer *Clostridium difficile* Infektion (CDI) passen, wird von einer asymptomatischen Kolonisation gesprochen. Desweiteren kommt es auch in Frage, dass es sich um einen atoxigenen Stamm handelt. Bei gesunden Erwachsenen sind bis zu 3 % der Bevölkerung betroffen [Kuijper et al., 2006]. Wesentlich höher ist die Kolonisationszahl mit bis zu 80 % bei Neugeborenen und Säuglingen. Neben atoxigenen Stämmen wurden auch toxische Stämme bei Kindern nachgewiesen [Rousseau et al., 2012; Larson et al., 1982]. Studien beschreiben als mögliche Gründe der Asymptomatik bei Babys die nicht abgeschlossene Entwicklung der Darmflora sowie verschiedener Rezeptoren im Epithelgewebe [Wilson, 1993]. Ein weiterer Faktor für eine Kolonisation ist der Aufenthalt in Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen, 15 – 35 % der Patienten sind Träger der Erreger, der Großteil der Patienten bleibt jedoch asymptomatisch und bietet den Bakterien so ein optimales Reservoir [Barbut and Petit, 2001]. Im Allgemeinen gilt, je länger der Aufenthalt in einem Krankenhaus dauert, umso höher ist das Risiko einer Kolonisation mit *C. difficile*. Nach der Behandlung einer Ersterkrankung durch *C. difficile* kann es innerhalb von zwei Jahren zu einem Rezidivfall kommen, das heißt, dass der Stamm im Intestinaltrakt verbleibt ohne Symptome zu verursachen [Bergamin et al., 2000; Marsh et al., 2012; Silva Júnior, 2012].

2.5.2 *Clostridium difficile* Infektion (CDI)

Ein notwendiges diagnostisches Kriterium für eine CDI ist eine Diarrhö, verschiedene Risikofaktoren (höheres Lebensalter, Antibiotika Therapie, Immunstatus, etc.) können den Verdacht unterstützen. Abhängig von der Virulenz des Erregers und dem Gesundheitszustand des Patienten können sich verschiedene Krankheitsbilder der CDI entwickeln. Angefangen mit einer mild verlaufenden Diarrhö bis hin zu einer pseudomembranösen Kolitis [Fekety and Shah, 1993; Kelly and LaMont, 1998]. Ende der 70er Jahre wurde *C. difficile* erstmals als Humanpathogen im Zusammenhang mit

der Verabreichung von Antibiotika identifiziert [Bartlett et al., 1978]. Heute belegen Studien, dass ca. 15 - 25 % der Patienten welche eine Antibiotika Therapie erhalten an einer Antibiotika-assoziierten Diarrhö (AAD), durch *C. difficile* ausgelöst, erkranken [Bartlett, 2006; Bartlett and Gerding, 2008]. Typischerweise setzt die Diarrhö während oder unmittelbar nach Beginn einer Antibiotika Therapie ein, jedoch sind typische Symptome auch bis zu 8 Wochen nach Beendigung der Therapie nicht auszuschließen. Als zusätzliche Begleitsymptome können Bauchkrämpfe, Fieber, Leukozytose oder Hypoalbuminämie auftreten [Bartlett and Gerding, 2008]. Die Diagnostik einer CDI erfolgt über den Nachweis der Toxine TcdA/TcdB.

2.5.3 pseudomembranöse Kolitis (PMC)

Bei dem Krankheitsbild der pseudomembranösen Kolitis (PMC, eng.: pseudomembranous colitis) handelt es sich in > 95 % aller Fälle um die schwere Verlaufsform einer CDI [Robert Koch Institut, 2011]. Befindet sich die Darmflora des Menschen im Ungleichgewicht, kann die natürliche Abwehr gegen Humanpathogene, die Kolonisierungsresistenz, nicht mehr optimal arbeiten. In Folge dessen können sich *C. difficile* Bakterien ungehindert vermehren und die Kolonschleimhaut besetzen [Köppen, 2010a]. Als größter Risikofaktor zählt die Behandlung mit Antibiotika, die Kommensale werden unterdrückt und die resistenten *C. difficile* Erreger können sich ausbreiten und mit der Toxinproduktion beginnen. Aus einem gewissen Anteil der AAD entwickeln sich im schlimmsten Fall eine PMC. Durch die Freisetzung der Toxine TcdA/TcdB und der resultierenden Zerstörung der Epithelzellen kommt es zu einer vermehrten Abgabe von Flüssigkeit und wichtigen Elektrolyten. Typisch für eine PMC ist die Ausbildung weißlich-gelber Plaques, zu sehen in der Abbildung 5, welche sich vorwiegend aus Fibrin, Leukozyten und Epithelnekrosen zusammensetzen. Abhängig vom Schweregrad der PMC können die Plaques große Flächen der entzündlichen Mukosa konfluieren. Die Leitsymptome einer PMC sind schleimig-blutige Durchfälle begleitet von Fieber und krampfartige Bauchschmerzen [Surawicz and McFarland, 1999; Köppen, 2010; Darai et al., 2011]. Mögliche Folgen einer PMC ist ein hypovolämischer Schock, die Entwicklung zum toxischen Megakolon sowie Darmperforationen [Thiel and Roewer, 2009]. Auch bei einer PMC ist der Nachweis

der *C. difficile* Toxine TcdA/TcdB erforderlich, mit Hilfe der Endoskopie sind die typischen Pseudomembranen gut zu erkennen [Köppen, 2010b].

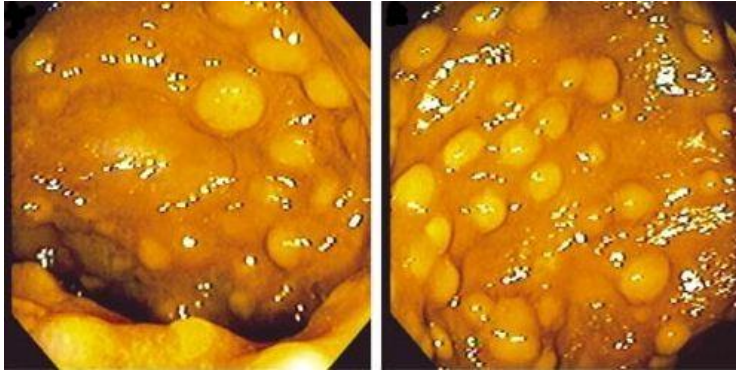


Abbildung 5: endoskopische Aufnahme einer pseudomembranösen Kolitis, weißlich-gelbe Plaques (Pseudomembranen) [Younus and Steigbigel, 2004]

2.5.4 toxisches Megakolon

Das toxische Megakolon, als Komplikation entzündlicher Darmerkrankungen einzuordnen, ist ein Ausdruck schwerer klinischer Verläufe einer vorangegangenen Darmerkrankung, dazu zählen Colitis ulcerosa (6-13 %), Morbus Crohn (2-6 %) sowie eine infektiöse Kolitis. Dieses vergleichsweise seltene Krankheitsbild kann sich aus einer durch *C. difficile* ausgelösten PMC entwickeln und lebensbedrohliche Folgen für den Patienten haben. Ausgehend von einer Entzündung der gesamten Kolonwand kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer akuten Ausdehnung (Dilatation) des Kolons (> 6 cm). Begleitet wird die Dilatation meist von Fieber, Leukozytose und Peritonismus (Reizung des Bauchfells), weiterhin kann es zu einem hypovolämischen Schock oder zu einer Sepsis kommen [Schifferli et al., 2008; Leifeld and Kruis, 2012]. Die Diagnostik eines toxischen Megakolons in Folge einer CDI muss auch hier durch den Nachweis der Toxine TcdA/TcdB belegt werden, eine Röntgenuntersuchung des Bauchraums macht die Dilatation des Kolons sichtbar [Leifeld and Kruis, 2012]. Die zugehörige Abbildung 6 zeigt eine Röntgenaufnahme, deutlich sichtbar ist der stark vergrößerte Abschnitt des Dickdarms [Schunter et al., 2007].



Abbildung 6: Röntgenaufnahme des Abdomens: Dilatation des Kolons [Schunter et al., 2007]

2.5.5 Rezidiv

Als Rezidiv (eng.: relapse) bezeichnet man in der Medizin das wiederholte Auftreten einer Erkrankung, nachdem diese bereits vollständig abgeheilt war. In Bezug auf den Rückfall einer CDI, unabhängig ob es sich um einen neuen Stamm handelt oder um den Stamm der Erstinfektion, ist die Rezidiv-Rate im Gegensatz zu anderen bakteriellen Infektionen mit 15-35 % als recht hoch zu bewerten [Barbut et al., 2000]. Diese Zahlen sind vermutlich in der Fähigkeit der Sporenbildung von *C. difficile* begründet. Außerhalb der vegetativen Form ist das Bakterium nicht in der Lage Toxine zu produzieren, während einer Antibiotika Therapie verschwinden die Symptome vorerst. Nach Abschluss der Therapie und Normalisierung der Bedingungen im Intestinaltrakt beginnen die Sporen mit der Keimung, die vegetative Form startet die Toxinproduktion erneut [Bartlett et al., 1980; Wilcox and Spencer, 1992; Tang-Feldman et al., 2003]. Nach einer Antibiotika Therapie kann nicht automatisch von einer vollständigen Elimination des Erregers der ersten Episode ausgegangen werden. Es besteht die Chance einer Reinfektion mit demselben Erreger beziehungsweise einer Infektion mit einem neuen Stamm. Der Mechanismus der Reinfektion ist aufgrund fehlender Daten noch nicht eindeutig nachvollziehbar. Bereits vorliegende Studien beschäftigen sich zum Großteil mit geringen Patientenzahlen (< 30) aus einer einzelnen medizinischen Einrichtung, eine klare Aussage ist nicht abzuleiten [Barbut et al., 2000].

2.5.6 Risikofaktoren

Seit dem Bartlett 1978 die *C. difficile* Bakterien als Auslöser der PMC sowie der milder verlaufenden AAD identifiziert hat, beschreiben einige Studien immer gleiche Faktoren, welche eine CDI begünstigen [Bartlett et al., 1978c]. Als wichtigster Risikofaktor ist die Antibiotika Therapie zu nennen. Der Einsatz von Antibiotika hat eine Schädigung der Normalflora zur Folge, damit besteht auch kein Kolonisationsschutz gegenüber den Pathogenen mehr. *C. difficile* kann sich ungehindert vermehren und das Epithelgewebe besetzen [Johnson, 2009; Choi et al., 2011]. Ein weiterer Risikofaktor ist das Alter, ab 65 Jahren steigt die Zahl der CDI Erkrankungen deutlich an. Gründe dafür werden in einem geschwächten Immunsystem sowie der höheren Zahl an Erkrankungen vermutet. Der Faktor des Alters ist meist nur in Zusammenhang mit weiteren Punkten als Risiko einzustufen, da auch in den jüngeren Generationen Fälle der CDI präsent sind. *C. difficile* Bakterien werden zu den nosokomialen Erregern geordnet, in einer Studie von Silva Júnior aus dem Jahr 2012 heißt es sinngemäß, je länger der Krankenhausaufenthalt, umso größer ist die Chance einer *C. difficile* Kolonisation [Silva Júnior, 2012]. Demzufolge stellt gerade der Aufenthalt in Krankenhäusern einen besonderen Risikofaktor dar. Ebenfalls als Risiko einzustufen, sind Medikamente welche als Protonenpumpenhemmer (eng.: proton pump inhibitor, PPI) fungieren. Diese Mittel schränken die Produktion der Magensäure zur Behandlung verschiedener Magenerkrankungen ein. Aufgrund der resultierenden Veränderung des pH-Werts im Magen können *C. difficile* Bakterien diesen in großer Zahl passieren. Unter normalen pH-Bedingungen im Magen trakt wäre es dem Großteil der Bakterien nicht möglich zu überleben, auf die Sporen hätte der saure pH-Wert keinen Einfluss [Nerandzic et al., 2009; Kim et al., 2010].

2.6 Diagnostik einer *C. difficile* Infektion

Die Einleitung einer *C. difficile* Diagnostik setzt im Normalfall typische klinische Symptome für eine CDI voraus, in erster Linie handelt es sich dabei um eine Diarrhö mit eventuellen Begleiterscheinungen wie Fieber und Bauchkrämpfen. Die *C. difficile*

Diagnostik erfolgt in der Regel aus frisch gewonnenem Stuhlmaterial der Patienten. Als Goldstandard gilt der Nachweis der spezifischen Toxine unter Verwendung eines Zytotoxizitätstests. In den ersten Jahren der *C. difficile* Diagnostik wurde das Zytotoxin TcdB mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests nachgewiesen. Dafür wurde die bearbeitete Stuhlsuspension auf Monolayer permanenter Zelllinien, oft Fibroblasten, gegeben. Nach 24-48 h war ein zytopathischer Effekt (CPE) in Form abgerundeter Zellen zu beobachten. Die Zugabe spezifischer Antiseren bewirkte die Aufhebung des CPE. Testverfahren dieser Art sind im Laufe der letzten Jahre durch standardisierte, weniger aufwendige sowie billigere Methoden ersetzt worden [Tabaqchali and Jumaa, 1995; Ackermann, 2004b]. Dennoch gilt der Zytotoxizitätstest als sensitivstes Verfahren auf dem Markt, da er Toxinkonzentrationen im picogramm-Bereich detektieren kann [Wilkins and Lyerly, 2003]. Trotz der großen Vielfalt mikrobiologischer und molekularbiologischer Testverfahren ist es ein allgegenwärtiger Diskussionspunkt, welche Kombination der Tests die optimale Lösung für Labor und Patient darstellt [Tenover et al., 2011].

2.6.1 mikrobiologischer Nachweis

Kultivierung von *C. difficile*

Im Vorfeld der Kultivierung ist es möglich eine Sporens Selektion mit Hilfe alkoholischer Aufschwemmung oder Erhitzung der Proben durchzuführen. Diese Art der Sporens Selektion erhöht die Isolationsrate der Bakterien. Zur Kultivierung der Stuhlproben wird ganz klassisch ein CCF-Medium nach George verwendet. Wichtige Bestandteile des Selektivmediums sind Cefoxitin, Cycloserin, Fructose und gegebenenfalls 5 % Eidotter-NaCl im Verhältnis 1:1. Der Zusatz von Taurocholat in reiner Form fördert die Auskeimung der Sporen und steigert die Sensitivität [George et al., 1979; Wilson et al., 1982; Kist et al., 2000]. Die Inkubation der Kulturen erfolgt unter anaeroben Bedingungen für mindestens 48 h bei 37 °C. Ziel der Kultivierung ist die Isolation von *C. difficile* aus Stuhlproben, kommerzielle Firmen bieten mittlerweile eine breite Palette an Flüssig- und Festmedien mit verschiedenen Zusätzen zur Isolation des Erregers an.

Fäbemethoden für den mikroskopischen Nachweis der Bakterien/Sporen

Abhängig von dem verwendeten Nährmedium präsentieren sich die *C. difficile* Kolonien in einem charakteristischen phänotypischen Äußeren. Ein deutlicher Hinweis für die Anwesenheit der gesuchten Erreger ist der typische kresolartige Geruch nach „Pferdestall“. Zur Erhärtung des Verdachts ist eine mikroskopische Untersuchung der kultivierten Präparate auf sporenbildende gram- positive Stäbchen hilfreich. Zum einen stellt die Gramfärbung eine klassische Methode zur Differenzierung dar, gram-positive *C. difficile* Bakterien erscheinen in einem blauen Farbton. Sind die Kulturen älter kann es zu einer Gram- Labilität kommen, die gram-positiven Stäbchen können sich als gram-negative zeigen. Zum mikroskopischen Nachweis der Sporen kommt eine Malachitgrün-Färbung zum Einsatz. Die Sporen zeigen sich in einem grünen Farbton, *C. difficile* in seiner vegetativen Form zeigt sich in roter Färbung [Günther, 2010].

ELISA-Verfahren

Mittlerweile gibt es eine breite Auswahl verschiedener Testsysteme welche alle auf dem Prinzip der Antikörper-Antigen-Bindung aufbauen, dazu gehören Agglutinationstests, Lateral-Flow-Assays (LFA) Toxin- sowie Antigen-ELISAs. Für die *C. difficile* Diagnostik essentiell ist in erster Linie der Nachweis beider Toxine, TcdA und TcdB. Moderne Toxin-ELISAs bieten hier eine schnelle und preislich vertretbare Lösung an. Die Sensitivität dieser Testverfahren ist im Vergleich zu anderen Systemen recht unbeständig. Der Grund dafür liegt nicht unbedingt bei den Testverfahren selbst, vielmehr liegt es an der relativen Instabilität der Toxine im Probenmaterial [Eastwood et al., 2009]. Abnahme, Transport und Lagerung der Proben müssen nach gewissen Richtlinien erfolgen um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten [Freeman and Wilcox, 2003]. Aus diesem Grund ist die Einzelanwendung der Toxin-ELISAs nicht zu empfehlen, in Kombination mit der *C. difficile* Kultur werden deutlich bessere Ergebnisse erzielt [Kist et al., 2000; Ackermann, 2004]. Eine neue vielversprechende Methode stellt das Antigen-Assay zur Detektion *C. difficile* spezifischer Glutamatdehydrogenase (GDH) dar. Unter Verwendung dieses Assays ist es nicht

möglich zwischen toxischen und atoxigenen Stämmen zu unterscheiden, ein Toxin-Nachweis ist im Fall eines positiven Testergebnisses unumgänglich da ca. 20 % der GDH positiven Patienten Träger atoxigener Stämme sind. Studien berichten von einer annähernd guten Sensitivität sowie Spezifität des GDH-Assays im Vergleich zur PCR. Aufgrund der hohen Produktionsrate des „common antigen“ ist die Detektion einfach und zuverlässig [Wilkins and Lyster, 2003; Zheng et al., 2004].

2.6.2 molekularbiologischer Nachweis

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methodik weist ebenfalls verschiedene Ansätze der Detektion auf. Zum einen ist es möglich *C. difficile* allgemein, egal ob toxisch oder atoxisch, per Detektion spezifischer Gene (16s rDNA) nachzuweisen [Woo et al., 2008]. Zum anderen besteht die Möglichkeit die Toxingene *tcdA* und *tcdB* sowie eine Mutation im Regulatorgen *tcdC* nachzuweisen. Letzteres dient der Verdachtsanalyse hinsichtlich hypervirulenter *C. difficile* Stämme [Sloan et al., 2008]. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Verfahren gelingt eine zuverlässige Identifizierung der Träger der Bakterien, jedoch führt die niedrige Nachweisgrenze der PCR auch zu einer schwierigen Interpretation der Ergebnisse [Ackermann, 2004b]. Empfohlen wird der Einsatz der PCR-Methodik ausschließlich in Zusammenhang mit einer klinischen Symptomatik. Auch die Nachuntersuchungen sanierter CDI-Patienten liefern im Normalfall kein aussagekräftiges Ergebnis, da der Patient den Erreger noch einige Zeit nach einer abgeschlossenen Behandlung ausscheiden kann. Die PCR bietet eine schnelle und zuverlässige Diagnostik, welche jedoch mit finanziellem Aufwand in Verbindung steht.

2.6.3 Diagnostik in Europa

Eine Studie von Barbut et al. aus dem Jahr 2003 ermöglicht einen interessanten Überblick über den Einsatz verschiedener Methoden innerhalb europäischer Krankenhäuser zur klinischen Diagnostik von *C. difficile*. Alle 212 Teilnehmer dieser Studie stammen aus europäischen Ländern und sind folgendermaßen aufgeteilt:

Deutschland (67), Frankreich (52), Italien (23), England (20), Spanien (18), Belgien (16), Niederlande (10) und Dänemark (6). In etwa die Hälfte aller Rücksendungen (47,6 %) kam von Universitätskliniken alle weiteren Daten stammen aus kleineren Krankenhäusern (< 500 Betten) und freien Laboren.

In 93 % aller Fälle führen die Labore eine Detektion der Toxine direkt aus dem Stuhlmaterial durch, lediglich in Dänemark erfolgt eine Kultivierung. Erst aus der Kultur wird eine Toxin-Detektion durchgeführt. Zum Nachweis der Toxine TcdA und TcdB werden zum einen Enzym-Immunassays (EIA) in 79 % der Einrichtungen und Zytotoxizitäts-Assays in 17,3 % der Einrichtungen verwendet. Die Methodik der *C. difficile* Kultivierung wurde in 55 % der Laboreinrichtungen durchgeführt, dabei gaben 32,3 % der Einsender an, die Proben im Vorfeld aufzuarbeiten (alkoholische Aufschwemmung 69,7 %). Ein Großteil (82 %) der Einrichtungen gab eine Inkubationszeit von 48 h an. Die Detektion der *C. difficile* spezifischen GDH wurde lediglich in 5,9 % der Laboratorien durchgeführt, noch seltener kam die PCR (1,9 %) zum Einsatz [Barbut et al., 2003].

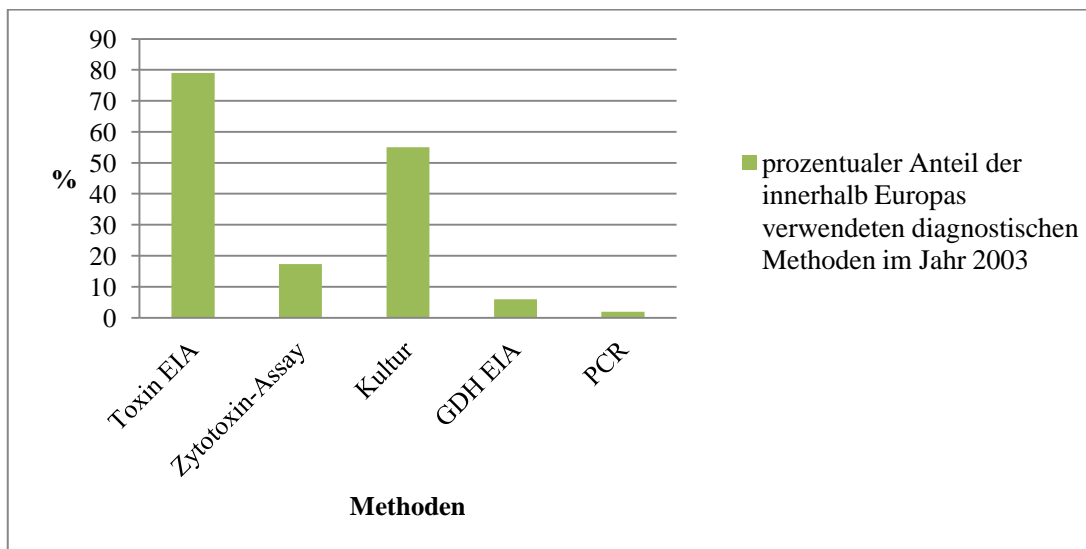


Abbildung 7: Überblick der verwendeten diagnostischen Verfahren in Europa im Jahr 2003 [Barbut et al., 2003]

3 Zielstellung

C. difficile als nosokomialer Enteropathogen ist verantwortlich für 15-25 % aller AAD [Bartlett and Gerding, 2008]. Innerhalb der letzten 10 Jahre ist ein Anstieg der Inzidenz sowie eine Zunahme schwerer Krankheitsverläufe zu beobachten. Weltweit wird von *C. difficile* Ausbrüchen in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen berichtet, welche oft im Zusammenhang mit neuen hypervirulenten Stämmen wie den Ribotypen 027, 017 oder 078 stehen [Warny et al., 2005; Kato et al., 2005; Indra et al., 2009; Lessa et al., 2012]. Eine schnelle und sichere Diagnostik ist aufgrund der ständigen Entwicklung dieses Erregers unumgänglich. Hersteller bemühen sich alt-bewährte Methoden zu optimieren und neue Methoden in der Labordiagnostik zu etablieren. Innerhalb dieser Bachelorarbeit geht es um die Evaluierung eines Immunoassays basierend auf dem Nachweis *C. difficile* spezifischen Glutamatdehydrogenase (GDH). Diese Evaluierung fand im Rahmen der Studie „Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* specific Glutamatdehydrogenase (GDH) in stool samples” in Zusammenarbeit mit der Firma R-Biopharm aus Darmstadt sowie der Zentrum für Diagnostik (ZfD) GmbH aus Chemnitz statt. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch auf dem Vergleich verschiedener kommerzieller Nachweismethoden aus den Bereichen der Mikrobiologie sowie der Molekularbiologie. Die Optimierung der *C. difficile* Diagnostik aus der wirtschaftlichen und vor allem der medizinischen Sichtweise ist international immer wieder ein Diskussionspunkt. Diese Arbeit gibt einen Überblick über die Eckdaten verschiedener Methoden unter dem Einsatz in einem Routinelabor. Ebenso soll diese Untersuchung die Leistungsfähigkeit der Routinediagnostik, bestehend aus *C. difficile* Kultur und Toxin-ELISA, der mikrobiologischen Abteilung der ZfD GmbH Chemnitz im Vergleich zu neueren Methoden (PCR, GDH-ELISA) darstellen. Abhängig von den Ergebnissen der Arbeit soll die Routinediagnostik verändert werden um eine Verbesserung der Diagnostik zu erreichen. Verglichen wurden die Kultur unter Verwendung eines Selektivagars mit verschiedenen Inkubationszeiten, ein Immunoassay zum Nachweis der Toxine TcdA und TcdB, das evaluierte GDH-ELISA sowie ein kommerzielles GDH-ELISA und zwei real-time PCR Verfahren zur Detektion der Toxingene beziehungsweise dem Erreger selbst.

4 Material

4.1 Geräte

Aufreinigung und PCR

- | | | |
|-----------------------|--------------|------------------------|
| ▪ Aufreinigungsgerät: | Maxwell 16® | Promega GmbH, Mannheim |
| ▪ Thermocycler: | Rotor Gene Q | Quiagen GmbH, Hilden |

ELISA

- | | | |
|-----------------------|----------------|--|
| ▪ ELISA-Vollautomat : | DSX™ 4-Platten | Dynex Technologies GmbH, Denkendorf |
|-----------------------|----------------|--|

Zentrifugen und Vortexer

- | | | |
|----------------|-----------------|---|
| ▪ Vortexer: | Vortex Genie 2™ | BENDER & HOBEIN AG, Zürich |
| ▪ Zentrifugen: | Megafuge 1.0 | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| | Mikro 200 | Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen |
| | Rapid | LFT Labortechnik GmbH, Wasserburg |

Kühl- und Brutschränke

- | | | |
|-----------------|-------------|---------------------------------------|
| ▪ Brutschrank: | Kelvitron®t | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| ▪ Kühlschränke: | Profi line | LIEBHERR-International AG, Bulle |
| | Premium | LIEBHERR-International AG, Bulle |
| | FK07 | FRYKA-Kältetechnik GmbH, Esslingen |

Sterilbänke

- | | | |
|----------------|---------------|--|
| ▪ Sterilibank: | Kendro HPH 12 | Kendro Laboratory Products GmbH Asheville |
| ▪ PCR-Box: | SafeCab | LFT Labortechnik GmbH, Wasserburg |

weitere Geräte

- | | | |
|-------------------|-----------------|-------------------------------|
| ▪ Pipetten: | Reference | Eppendorf AG, Hamburg |
| ▪ Anaerobierbox: | GENbox | BioMérieux SA, Marcy l'Etoile |
| ▪ Gasgeneratoren: | GENbag microaer | BioMérieux SA, Marcy l'Etoile |
| | GENbox microaer | BioMérieux SA, Marcy l'Etoile |

4.2 Kits

Aufreinigung: Maxwell®16 Tissue LEV Total RNA Purifikation Kit-Promega GmbH, Mannheim

- 48 Maxwell® 16 LEV Total RNA Cartridges
- 50 ml RNA Lysis Buffer (RLA)
- 44 ml RNA Dilution Buffer (RDB)
- 0.9 ml 97.4 % β -Mercaptoethanol (BME)
- 6.5 ml Clearing Agent (CAA)
- 25 ml Nuclease-Free Water
- 50 Clearing Columns
- 50 Collection Tubes
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes, 0,5 ml

Antigen-ELISA: Wampole® C.DIFF CHEK™-60-TECHLAB, Inc., Blacksburg

- 40 ml Diluent
- 7 ml Conjugate
- 14 ml Substrate
- 4,5 ml Positive Control
- 50 ml Wash Buffer Concentrate (20x)
- 7 ml Stop Solution
- 1 Microassay Plate (12x8 wells)
- 50 Applicator Sticks
- 100 Disposable plastic pipettes (100 ml)

Antigen-ELISA: RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-R-Biopharm AG,
Darmstadt

- 100 ml Diluent
- 10 ml Conjugate 1
- 10 ml Conjugate 2
- 10 ml Substrate
- 1,8 ml Positive Control
- 100 ml Wash Buffer (10x)
- 6 ml Stop Solution
- 1 Microassay Plate (12x8 wells)

Dieser Test wurde innerhalb der Bachelorarbeit evaluiert, es kam zur Testung 3 verschiedener Pilotchargen.

Toxin-ELISA: RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B-R-Biopharm
AG, Darmstadt

- 100 ml Diluent
- 10 ml Conjugate 1
- 10 ml Conjugate 2
- 10 ml Substrate
- 1,8 ml Positive Control
- 100 ml Wash Buffer (10x)
- 6 ml Stop Solution
- 1 Microassay Plate (12x8 wells)

real-time PCR: RIDA[®] GENE Clostridium difficile & Toxin A/B V-R-Biopharm AG, Darmstadt

- 2x 1000 µl C. difficile Reaction Mix
- 2x 1000 µl Toxin A/B Reaction Mix
- 180 µl Positive Control
- 20 µl Taq-Polymerase
- 500 µl PCR Water

4.3 Medien

Clostridium difficile Agar – CLO, 90 mm-BioMérieux SA, Marcy l'Etoile

- Tierisches Pepton 21 g/l
- Hammelblut 50 ml/l
- Cycloserin 0,1 g/l
- Cefoxitin 0,008 g/l
- Amphotericin B 0,002 g/l

4.4 Software

PCR/ELISA

- PCR: Rotor-Gene Q Series 2.0.2 Quiagen GmbH, Hilden
- ELISA: Revelation[™] R-Biopharm AG, Darmstadt

4.5 Probenmaterial

4.5.1 Probenmaterial zum der Reproduzierbarkeit

Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des RIDASCREEN[®] Clostridium difficile GDH-ELISAs stellte die Firma R-Biopharm 6 Referenzlösungen mit verschiedenen His6-GDH Konzentrationen zur Verfügung.

- Reference Solution 1: 1,794 ng/ml
- Reference Solution 2: 1,432 ng/ml
- Reference Solution 3: 1,076 ng/ml
- Reference Solution 4: 0,717 ng/ml
- Reference Solution 5: 0,538 ng/ml
- Reference Solution 6: 0,256 ng/ml

4.5.2 Probenmaterial zum Test innerhalb der Studie

Zur Durchführung aller Nachweisverfahren wurden im Vorfeld präzise Anforderungen für alle verwendeten Proben festgelegt. Bei dem Probenmaterial handelte es sich ausschließlich um Stuhlproben von Patienten der Klinikum Chemnitz gGmbH sowie umliegende Krankenhäuser. Folgende Kriterien waren maßgebend:

- Patientenproben mit Verdacht/Untersuchungsanforderung auf CDI
- Schwach geformte oder flüssige Proben
- Probenvolumen von mindestens 1,5 ml/g
- Transport/Lagerung der Proben nach Abnahme: innerhalb eines Tages bei Raumtemperatur (RT), >1Tag-3Tage nach Abnahme bei 2-8 °C
- Homogenisieren der Proben mit Aquadest (falls notwendig) vor Beginn der Tests
- keine Mehrfachtests, es darf nur eine Probe pro Patient getestet werden

Zum Ausschluss der Proben aus der Testreihe führt zu wenig Probenmaterial (<1,5 ml/g), sichtbar veränderter Stuhl durch Blut, Barium oder andere Substanzen, feste Proben, falsch gelagerte/transportierte Proben oder die Entnahme der Proben aus der Kühlkette für mehr als 8 Stunden.

5 Methoden

Im Rahmen der Studie „Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* specific Glutamatdehydrogenase (GDH) in stool sample“ wurden spezifische Regeln für die Auswahl der Proben sowie der Abarbeitung der angewendeten Methoden festgelegt. Konnten diese Kriterien nicht eingehalten werden, wurden die Proben aus der Studie ausgeschlossen. Der kulturelle Nachweis (48 h) sowie das RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B (R-Biopharm)-ELISA wurden innerhalb des Routinebetriebs des medizinisch mikrobiologischen Labors der „Zentrum für Diagnostik“ (ZfD) GmbH von geschultem Fachpersonal durchgeführt. Alle weiteren Tests wurden neben dem Routinebetrieb im selben Labor, beziehungsweise in Zusammenarbeit mit der molekularbiologischen Abteilung der ZfD GmbH bearbeitet. Um die Ergebnisse im Nachhinein statistisch auswertbar zu machen, mussten mindestens 300 Proben getestet werden. Im Verhältnis sollten 15-25 % der Proben ein positives Ergebnis aufweisen. Vor Beginn der Testreihe wurde das neue Assay der Firma R-Biopharm (RIDASCREEN® *Clostridium difficile* GDH) auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getestet. Alle angewendeten ELISA-Verfahren, inbegriffen die Reproduzierbarkeitsstudie, wurden mit Hilfe des DSX® Four-Plate Automated ELISA Processing System (DYNEX Technologies) abgearbeitet. Zur Sicherung des wertvollen Probenbestands sowie für eventuell erforderliche Nachuntersuchungen wurden zwei Rückstellproben zu je 200 µl pro Probe aliquotiert und bei -70 °C eingelagert. Die Primärgefäße mit enthaltenen Restmengen an Stuhlmaterial wurden nach Ablauf aller Testverfahren der jeweiligen Probe ebenfalls bei -70 °C eingefroren. Desweiteren wurden die Eluate täglich, nach Abschluss erfolgreicher real-time PCR Läufe bei -20 °C aufbewahrt.

5.1 Reproduzierbarkeitsstudie für das RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA

Bei der Evaluierung neuer Methoden ist es wichtig eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu ermitteln. Dabei wird das neue Testverfahren wiederholt unter gleichen Bedingungen getestet um eine Analyse der entstandenen Ergebnisse durchzuführen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs der Firma R-Biopharm wurden innerhalb von 5 aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt 10 Testläufe durchgeführt. Dabei wurde der erste Testlauf des Tages über den gesamten Zeitraum von der gleichen Person, der zweite Lauf des Tages von einer weiteren unabhängigen Person abgearbeitet. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit standen sechs Referenzproben (RP) verschiedener Glutamatdehydrogenase-Konzentrationen (GDH) der Firma R-Biopharm zur Verfügung. Die Reproduzierbarkeitsstudie erfolgte nach dem Prinzip der dreifach-Bestimmung.

Referenzproben und Testkits wurden vor jedem Testlauf eine Stunde bei RT gelagert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Antigene in den Raumtemperatur (RP) zu gewährleisten, wurden diese vor Gebrauch kurz geschüttelt und anschließend je 1 ml der jeweiligen RP in ein zugehörig beschriftetes Teströhrchen (TR) pipettiert. Nachfolgend wurden alle TR (sechs), im Reck einsortiert, im DSX platziert. Die verwendeten Reagenzien sowie der Waschpuffer des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-Kits wurden vor Beginn der Reproduzierbarkeitstests erneuert. Mit Hilfe des automatisierten Testsystems der DSX-Technologie konnten die Reproduzierbarkeitstests unter einheitlichen Bedingungen abgearbeitet werden.

5.2 Probenhandling

Nach Ankunft der Proben im Labor erfolgte eine Bewertung, welche zum Ausschluss oder zur Zulassung zur Studie führte. Dabei sollte der zeitliche Abstand zwischen Abnahme und Einsendung möglichst gering sein. Die Proben wurden nach Menge,

mindestens 1,5 ml/g, sowie Beschaffenheit, flüssig bis leicht geformt, bewertet. Leicht geformte Proben wurden, falls notwendig, minimal mit destilliertem Wasser im Primärgefäß homogenisiert. Erst nach Bewertung und Homogenisieren der Proben wurden diese zur Abarbeitung der Routinediagnostik sowie zu den Studien-Untersuchungen freigegeben. Alle angesetzten Testläufe mussten laut Studienprotokoll innerhalb von drei Tagen durchgeführt werden, zwischen den Untersuchungen wurden die Proben bei 5-8 °C im Kühlschrank gelagert.

5.3 Kultivierung von *C. difficile* aus Stuhlproben: 48h/96h

Innerhalb der Routinediagnostik erfolgte die Abarbeitung der Kultivierung der Stuhlproben. Verwendet wurde der *Clostridium difficile* Agar CLO-90 mm der Firma BioMérieux. Mit Hilfe einer sterilen Einmal-Impföse wurde eine kleine Menge (ca. Reiskorn groß) auf je einem halben Nährboden ausplattiert. Anschließend wurden die beimpften Agarplatten für 48 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 48 Stunden erfolgte eine Beurteilung der Kulturen anhand typischer morphologischer Merkmale sowie des Geruches der Bakterien. Außerhalb der Routinediagnostik wurden die Agarplatten weitere 48 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Nach 96 Stunden erfolgte die zweite Auswertung.

5.4 Identifizierung von *C. difficile* Kulturen

Bei der Identifizierung der *C. difficile* Bakterien nach einer Inkubation von 48 h beziehungsweise 96 h spielten folgende Kriterien eine Rolle: die typische Morphologie der Kolonien sowie der charakteristische Geruch als auch das phänotypische Aussehen der Bakterien unter dem Lichtmikroskop.

Nach einer Bebrütungsdauer von 48h auf CLO-Medium zeigten sich 3-8 mm große Kolonien gräulicher Färbung. Besonders auffällig ist der fransige Rand der rauen, heterogenen Oberflächenstruktur der Kolonien, gut in Abbildung 8 zu erkennen. Ein ebenfalls recht charakteristisches Merkmal der *C. difficile* Bakterien ist der starke Geruch nach „Pferdestall“, welcher aufgrund der Expression von para-Kresol zu

erklären ist. Als weiterer dienlicher Hinweis zur Identifizierung fungierte das Gram-Präparat, die Gram-positiven Stäbchen sind unter dem Lichtmikroskop gut zu erkennen. Nach 96 h erfolgte die zweite Bewertung unter gleichen Kriterien.



Abbildung 8: Kultur Probe 117, *C. difficile* Kolonien nach 48 h

5.5 Immunassay zum Nachweis der Toxine A/B von *C. difficile*

Zusätzlich zu dem kulturellen Nachweisverfahren für *C. difficile* wurde im Rahmen der Routinediagnostik das RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B-ELISA durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden Proben und Kits eine Stunde bei RT gelagert. In die Teströhrchen wurde je 1 ml Probenverdünnungspuffer (Diluent 1) vorgelegt. Nach kurzem schütteln der Probe wurden mit Hilfe einer Einmal-Pipette 100 µl Probenmaterial im Diluent suspendiert. Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgte durch Mischen mit einem Vortexmischer. Im Anschluss wurden die Teströhrchen fünf Minuten bei 3500 rpm (ca. 2500 g) zentrifugiert. Nachdem die Teströhrchen in das Reck einsortiert wurden erfolgte die automatisierte Abarbeitung des ELISAs mit Hilfe der DSX-Technologie nach dem Abarbeitungsprotokoll des Herstellers.

5.6 Immunassay zum Nachweis *C. difficile* spezifischer Glutamatdehydrogenase

In diesem Fall wurden zwei ELISA-Verfahren zum Nachweis *C. difficile* spezifischer Glutamatdehydrogenase (GDH) im Vergleich angewendet. Beide Verfahren funktionieren nach der gleichen Methodik, daher wurden die Tests parallel vorbereitet und abgearbeitet. Das Immunassay Wampole® C.DIFF CHEK™-60 des Herstellers TECHLAB ist bereits auf dem Markt erhältlich und basiert auf einem „ein-Konjugat-System“. Die Antikörper im Konjugat sind direkt mit dem Co-Faktor zur Aktivierung des Enzym-Substrat-Komplexes, der Peroxidase, markiert. Im Unterschied dazu wurde das GDH-ELISA der Firma R-Biopharm erstmalig in einer externen Studie getestet. Dieses Verfahren arbeitet mit einem „zwei-Konjugat-System“. Hier sind die Antikörper im Konjugat 1 über Sulfidbrücken mit Biotinmolekülen markiert, die Peroxidase ist im Konjugat 2 enthalten und bindet spezifisch an die Biotinoberfläche. Vor Beginn beider Testläufe wurden die Immunassays und die Patientenproben ein bis zwei Stunden bei RT gelagert. Im Anschluss an die Studie erfolgte aufgrund der Ergebnisse eine erneute Testphase für die modifizierten Pilotchargen 2 und 3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-Assays. Die Abarbeitung erfolgte unter Verwendung der gleichen Proben sowie der gleichen Verfahrensanleitung.

Probenvorbereitung für das TECHLAB-Assay:

Nachdem die Proben die RT erreicht hatten, wurden diese gründlich mit Hilfe eines Vortex-Mischers homogenisiert. In die jeweiligen Teströhrchen wurde je 1 ml Verdünnungspuffer vorgelegt und im Anschluss 250 µl Homogenisat unter Verwendung einer Einmal-Pipette suspendiert. Um wieder ein gleichmäßiges Homogenisat zu erhalten wurden die Teströhrchen erneut mit dem Vortex-Mischer geschüttelt. Im Anschluss wurden alle Suspensionen für 10 min bei 4000 rpm (ca. 3500 g) abzentrifugiert um störende Schwebeteilchen in einem Pellet zu fixieren. Für die automatische Durchführung der Tests wurden die Teströhrchen mit klarer Lösung der Reihenfolge entsprechend in ein Probenrack sortiert. Vorhandene Fettfilme auf den zentrifugierten Lösungen wurden vorher mit einem sterilen Tupfer entfernt.

Probenvorbereitung für das R-Biopharm-Assay:

Auch für das Immunassay des Herstellers R-Biopharm wurden die Proben im ersten Schritt auf RT erwärmt. Um vor Verwendung der Proben eine optimale Homogenisierung zu erzielen wurden die Proben ebenfalls mit Hilfe eines Vortex-Mischers gründlich geschüttelt. Nach der Vorlage von 1 ml Verdünnungspuffer (Diluent 1) in die jeweiligen Teströhrchen wurden je 100 µl Probenmaterial mittels einer Einmal-Pipette suspendiert. Zur Homogenisierung der verdünnten Proben wurde der Vortex-Mischer verwendet. Im letzten Aufarbeitungsschritt erfolgte eine Zentrifugation der Teströhrchen für 5 Minuten bei 3500 rpm (ca. 2500 g). Rückstände von Fett oder anderen Partikeln an der Oberfläche der abzentrifugierten Suspension wurden auch hier vor dem Einsortieren in das Probenrack mit einem sterilen Tupfer entfernt.

5.7 DNA Extraktion – Isolation *C. difficile* spezifischer Nukleinsäuren

In diesem Arbeitsschritt folgte die automatisierte Aufarbeitung der Stuhlproben für die anschließende polymerase Kettenreaktion (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR). Verwendet wurde dafür das Maxwell[®]16 Tissue LEV Total RNA Purifikation Kit des Herstellers Promega. Zur Vorbereitung wurden je 400 µl destilliertes Wasser in die jeweiligen Tubes vorgelegt und je 200 µl homogenisiertes Probenmaterial mit Hilfe einer Einmal-Pipette suspendiert. Um die Suspension optimal zu homogenisieren wurden die Tubes mehrere Sekunden mit einem Vortex-Mischer geschüttelt. Anschließend folgte die Zentrifugation der Tubes für 30 s bei 3000 g. In der Zwischenzeit wurde die erforderliche Anzahl an versiegelten Kartuschen in das Probenrack gesetzt und die zugehörigen Eluations-Tubes an den vorgesehenen Stellen platziert. Die Eluations-Tubes wurden mit je 200 µl Eluationspuffer (Nuclease Free Water) befüllt, anschließend erfolgte die Öffnung der Kartuschen. Nach Platzierung der Stößel in der jeweils ersten Kammer der Kartuschen wurden je 150 µl Überstand der zentrifugierten Probensuspensionen in die jeweils hinterste Kammer pipettiert. Zum Schluss wurde das gefüllte Probenrack im Maxwell[®]16 platziert und das Programm gestartet.

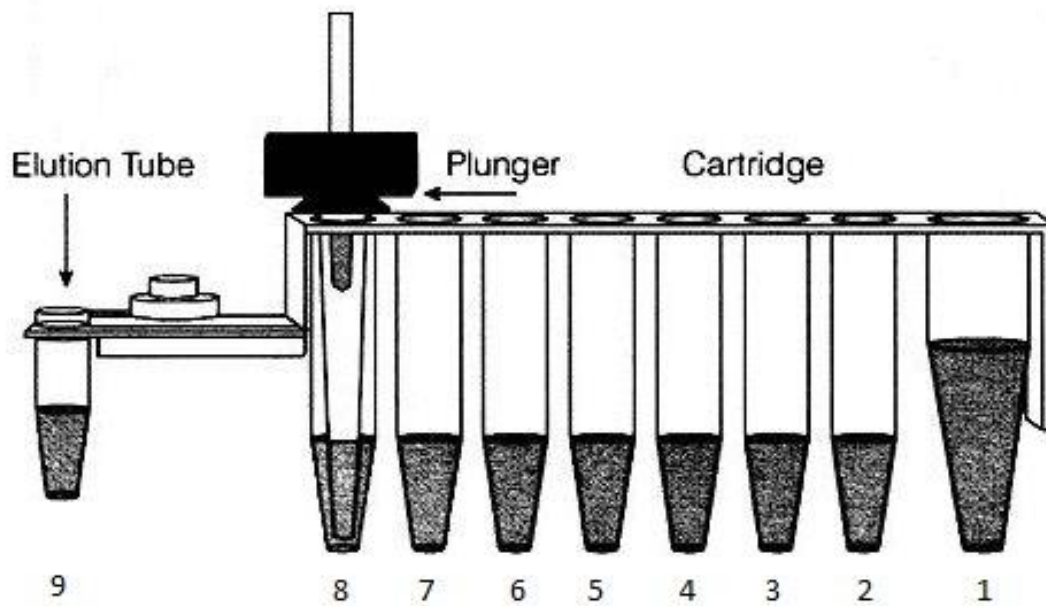


Abbildung 9: Aufbau einer Maxwell®16 Kartusche mit ihren Reaktionslösungen [Promega GmbH, 2011]

(9) Elutions-Tube: in die sterilen Tubes wurden vor Beginn der Aufreinigung je 200 µl Elutionspuffer vorgelegt, der letzte Arbeitsschritt der Aufreinigung beinhaltete die Überführung der isolierten DNA mit Hilfe der Magnetkügelchen. **(8) leere Kammer:** Platzierung des Stößels **(7) leere Kammer (6)(5)(4) Wasch-Puffer:** die Reinigung der gebundenen DNA erfolgt durch wiederholtes Waschen **(3) Lysis-Puffer:** mit Hilfe des Lysis-Puffers gelingt ein optimaler Zellaufschluss ohne die DNA zu zerstören **(2) paramagnetische Silica Partikel:** die freigesetzte DNA besitzt aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung und bindet so leicht an die eisenhaltigen paramagnetischen Silica-Kügelchen, welche als Transportmedium fungieren **(1) Lysis-Puffer + Probenhomogenisat:** nach Zugabe von je 150 µl der homogenisierten Probensuspensionen beginnt bereits die Lyse der Zellen, die DNA wird freigesetzt

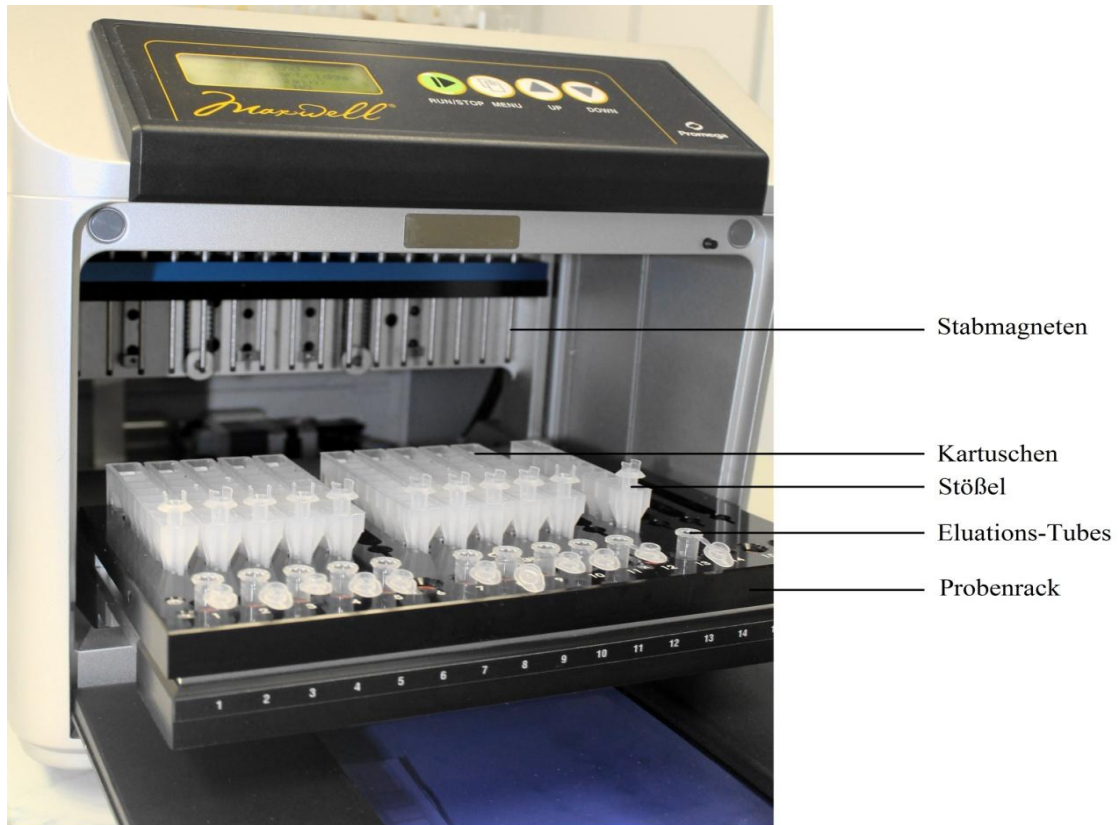


Abbildung 10: Aufbau des Maxwell®16 mit beladenem Probenrack

Die Funktionsweise des Gerätes basiert auf dem Transport der freigesetzten DNA mit Hilfe eisenhaltiger, paramagnetischer Silica-Kügelchen (eng. Paramagnetic Particles, PMPs). Nach der Aufspaltung der Zellen durch den Lysis-Puffer wird die negativ geladene DNA frei. Die Stabmagneten fahren in die Kunststoff Stößel, welche als Ummantelung beziehungsweise Kontaminationsschutz dienen und transportieren die PMPs in die jeweilige Reaktionskammer. Die PMPs sind mit Siliciumoxid (Silica), einem stark DNA-bindendem Material, beschichtet. Unter Anwesenheit von chaotropen Salzen (strukturbrechende Salze) bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus, die DNA bindet sehr effizient an der Silica-Membran der Partikel [Vogelstein and Gillespie, 1979; Boom et al., 1990]. Unter Verwendung der Stabmagneten werden die paramagnetischen Kügelchen in den Lösungen inkubiert sowie zwischen den Reaktionskammern einer Kartusche transferiert.

5.8 polymerase Kettenreaktion

Als weiteres Nachweisverfahren kam zusätzlich eine real time-PCR Methode zur Anwendung. Das verwendete Kit RIDA[®] GENE Clostridium difficile & Toxin A/B V des Herstellers R-Biopharm enthält zwei PCR-Reaktionslösungen, zum einen zum Nachweis der *C. difficile* spezifischen Toxingene tcdA und tcdB und zum anderen zum Nachweis des Bakteriums an sich, unwichtig dabei, ob es sich um einen Toxinbildner handelt oder nicht. Bei beiden PCR-Methoden handelt es sich um eine „real time“-PCR. Da es sich bei dem Probenmaterial um Stuhlproben handelte, wurden diese im Vorfeld mit Hilfe des Maxwell[®]16 von Promega aufgereinigt. Beide Arbeitsschritte (Aufreinigung und PCR) erfolgten am selben Tag. Zwischen beiden Prozessen lagen maximal 2-3 Stunden, in dieser Zeit wurden die Eluate bei 2-8 °C gelagert. Das entsprechende PCR-Kit (bei -20 °C aufbewahrt) wurde eine Stunde vor Beginn der Arbeit bei RT gelagert, anschließend wurden die Kavitäten kurz abzentrifugiert. Der Ansatz beider Mastermix-Lösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer PCR-Ansatz Box. Beide Lösungen wurden, dem Probenaufkommen angepasst, täglich neu angesetzt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1: Übersicht zum Ansatz der Mastermix-Lösungen [R-Biopharm, 2011]

| Kit-Code | Komponenten Master-Mix (MM) | Menge pro Reaktion | 10 Reaktionen + 10 % | 15 Reaktionen + 10% | 20 Reaktionen + 10 % | 30 Reaktionen + 10 % |
|-----------------|---|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 1 oder 2 | C. difficile Reaction Mix oder Toxin A/B Reaction Mix | 19,9 µl | 218,9 µl | 318,4 µl | 437,8 µl | 656,7 µl |
| 4 | Taq-Polymerase | 0,1 µl | 1,1 µl | 1,6 µl | 2,2 µl | 3,3 µl |
| | gesamt | 20 µl | 220 µl | 320 µl | 440 µl | 660 µl |

Im ersten Schritt der Mastermix Herstellung wurde die entsprechende Menge *C. difficile* Reaction Mix beziehungsweise Toxin A/B Reaction Mix in das jeweilige Cup pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Taq-Polymerase. Nach dem Verschließen der Mastermix-Cups in der Sterilbox wurden beide kurz angeschnippt und abzentrifugiert. Vor Beginn der Aliquotierung der Mastermix-Lösungen wurden die Reaktionsgefäße (200 µl Cups) in einen gekühlten (2-8 °C) Aluminiumblock gesetzt.

Aufgrund zwei verschiedener PCR Tests wurde die doppelte Anzahl an Reaktionsgefäßen benötigt, die erste Hälfte der Gefäße wurde mit je 20 µl Mastermix zum Nachweis der *C. difficile* 16s-rDNA befüllt, in die übrigen Gefäße wurden je 20 µl Mastermix zur Detektion der Toxingene *tcdA* und *tcdB* pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der aufgereinigten Proben sowie der negativ-/positiv-Kontrollen in einer Sterilbox. Suspendiert wurden je 5 µl Eluat in beide Mastermix-Lösungen, um Kontaminationen zu vermeiden wurden negativ- und positiv-Kontrollen im letzten Arbeitsschritt pipettiert.

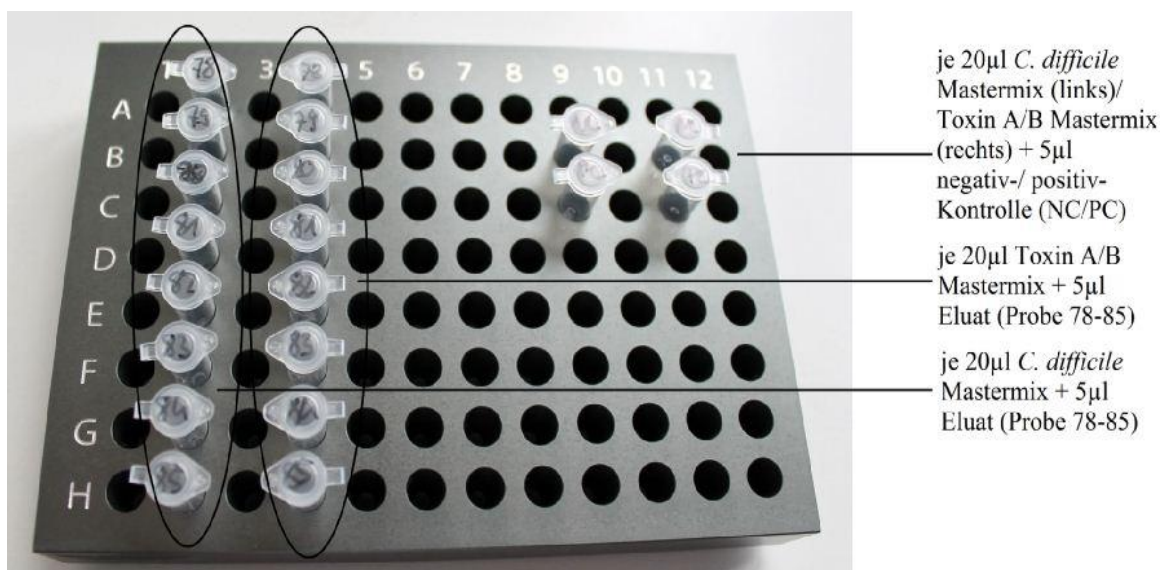


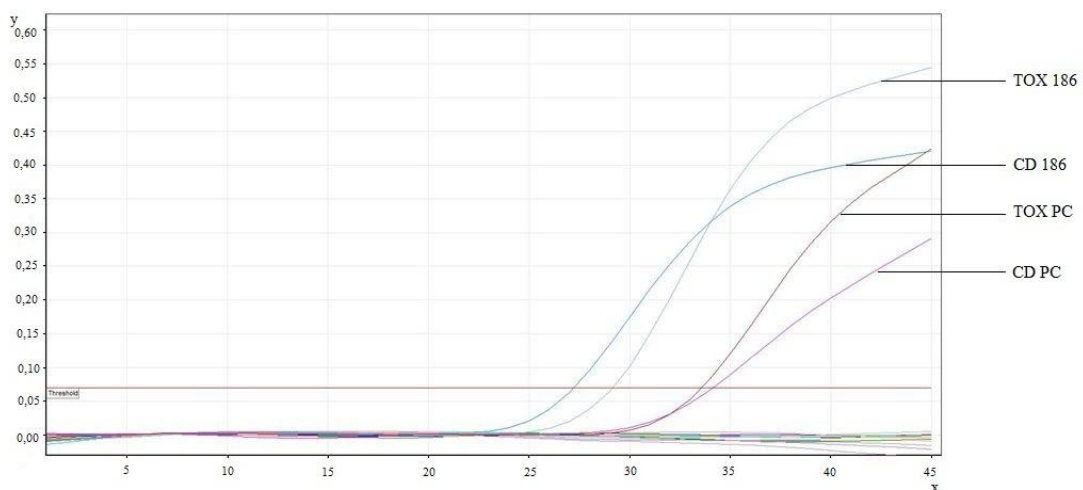
Abbildung 11: gekühlter Aluminiumblock mit Reaktionsgefäßen

Zur Durchführung der PCR-Reaktionen stand der real time-cycler Rotor Gene Q des Herstellers QIAGEN zu Verfügung. Aufgrund der maximalen Probenanzahl von 15 Proben pro Tag kam der 36-Well Rotor (rot) zur Anwendung. Nach korrekter Anordnung der Reaktionsgefäße im Rotor wurden diese mit einem Haltering fixiert und das Programm entsprechend der Geräteeinstellungen gestartet (PCR Protokoll siehe Tabelle 3).

Tabelle 2: real-time PCR Protokoll [R-Biopharm, 2011]

| | |
|---|---------------|
| Initiale Denaturierung (HOLD) | 5 min, 95 °C |
| Zyklen | 45 Zyklen |
| <u>PCR</u> Denaturierung | 15 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 30 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate/ Ramp Rate | Maximum |

Die Auswertung beider PCR-Verfahren erfolgte mit der Software Rotor-Gene Q Series 2.0.2 der Firma Quiagen. Um die Ergebnisse aller Läufe miteinander vergleichen zu können wurde, anhand vorheriger Testläufe, einen einheitlichen Threshold von 0,07 festgelegt. Desweiteren wurde der Programm integrierte Glättungsalgorithmus Slope Correct sehr verwendet. Die Abbildung 12 zeigt einen typischen Kurvenverlauf des Fluoreszenz-Signals. Unter dem Threshold verlaufende Kurven senden kein Lichtsignal, die sequenzspezifischen Sonden haben nicht gebunden, diese Proben sind negativ. Positive Kurven steigen über die Threshold-Grenze.

**Abbildung 12: Kurvenverlauf der Proben 182-188, Quantitation Analysis**

Achsenbeschriftung/Bezeichnungen: y-Achse: Fluoreszenz-Signal, x-Achse: Anzahl der Zyklen, TOX: Nachweis der Toxingene *tcdA/tcdB*, CD: Nachweis von *C. difficile* anhand der 16S rDNA, PC: positiv-Kontrolle, Die Kurven TOX PC und CD PC zeigenden Verlauf der positiv-Kontrollen beider real-time PCR Verfahren. Beide Kurven zeigen ein erstes Amplifikationssignal bei

einem Cycle Threshold (Ct)-Wert von 27 (+/-1) und steigen zwischen dem 30sten und 35sten Zyklus über den gesetzten Threshold von 0,07. Die Probe 168 zeigt zwei positive Amplifikationssignale, für die Toxin PCR liegt der Ct bei 27,25 und für die 16S rDNA PCR bei 28,82.

Die Abbildung 13 zeigt den optimalen Verlauf der zugehörigen internen Amplifikationskontrolle. Anhand dieses Kontrollsystems kann eine mögliche Inhibierung der PCR-Reaktion ausgeschlossen werden. Hohe Konzentrationen des Amplikons in der Probe können zu einer Schwächung des internen Amplifikationssignals führen, dieses Ergebnis hat jedoch keinen Einfluss auf die positive Bewertung der Probe.

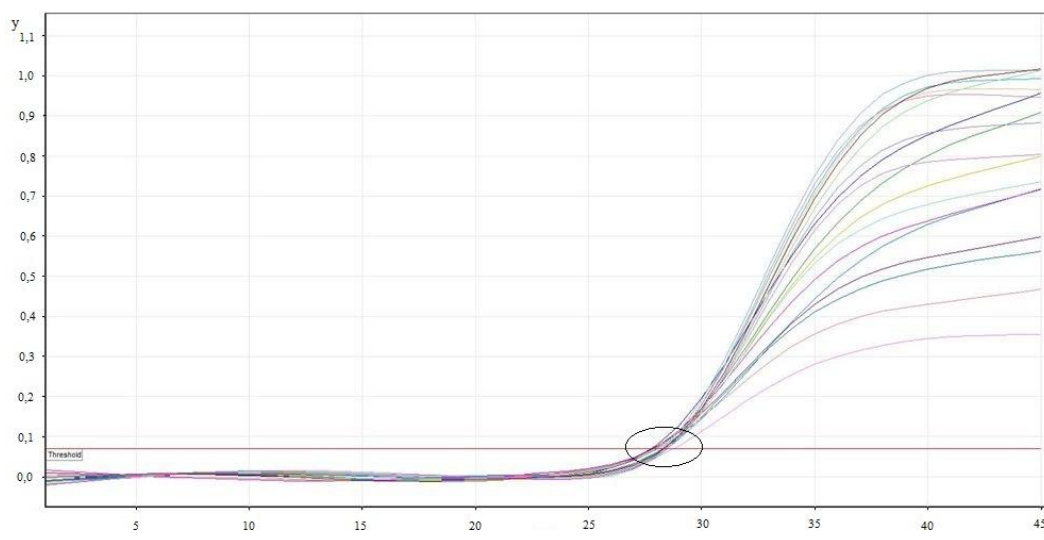


Abbildung 13: Kurvenverlauf der internen Amplifikationskontrolle der Proben 182-188

Achsenbeschriftung/Bezeichnungen: y-Achse: Fluoreszenz-Signal, x-Achse: Anzahl der Zyklen, Diese Grafik zeigt ein positives Amplifikationssignal aller Proben sowie der Kontrollen. Der gebündelte Übergang aller Kurven in den exponentiellen Anstieg spricht für eine saubere Vorbereitung der PCR-Lösungen (Mastermix+Probe/Kontrolle). Die Stärke des Signals kann von der Konzentration einer stark positiven Probe beeinflusst werden.

6 Ergebnisse

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit wurden im Zentrum für Diagnostik im Klinikum Chemnitz in den Abteilungen der medizinischen Mikrobiologie sowie der medizinischen Molekularbiologie erhoben. Im Zeitraum vom 13. Februar 2012 bis 04. Mai 2012 wurden 309 Proben von Patienten mit dem Verdacht auf CDI mit Hilfe fünf verschiedener Methoden getestet. 307 von 309 verwendeten Stuhlproben entsprachen den Anforderungen des Studienprotokolls und wurden in der festgelegten Zeit von maximal drei Tagen nach Einsendung in einem Routinelabor bearbeitet. Zur Anwendung kamen dabei bekannte und alt bewährte sowie neue mikrobiologische und molekularbiologische Testverfahren. Unter Punkt 6.1 dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der einzelnen Testverfahren aufgeführt. Der Punkt 6.2 gibt Auskunft über die Ergebnisse der Evaluierung des Antigen-ELISAs der Firma R-Biopharm. Aufgrund der Anzahl positiver Proben wurde ein Konfidenzniveau von 90 % zur Berechnung der spezifischen Testergebnisse verwendet. Abhängig von der Wahl der Referenzmethode bewegen sich die Prävalenz-Werte im Bereich von 11 %-21 %.

6.1 Vergleich der diagnostischen Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene diagnostische Verfahren angewendet um den nosokomialen Enteritiserreger *C. difficile* nachzuweisen. Innerhalb der üblichen Laborroutine wurden die Proben 48h auf einem Selektivnährmedium kultiviert und mit Hilfe eines ELISAs auf die Anwesenheit der Toxine TcdA und TcdB überprüft. Zum Einsatz kamen ebenso zwei Immunassays zum Nachweis des „common Antigen“, der *C. difficile* spezifischen GDH. Abschließend wurden alle Proben mit Hilfe zweier real-time PCR Verfahren getestet, dabei wurde zum einen die 16S rDNA zur Detektion des Bakteriums selbst und zum anderen beide Toxingene *tcdA* und *tcdB* nachgewiesen.

6.1.1 Kultureller Nachweis von *C. difficile*

Der kulturelle Nachweis von *C. difficile* aus Stuhlproben innerhalb der Routinediagnostik erfolgte unter Verwendung der CLO-90 mm Selektivagarplatten der Firma Biomeri  ux. Von insgesamt 307 getesteten Proben wiesen 59 ein positives Kulturergebnis nach 48 h Inkubation auf. Insgesamt 38 der Kultur-positiven Proben sind in allen weiteren Testverfahren ebenfalls positiv. Bei 11 der übrigen 21 Kultur-positiven Proben zeigte keines der anderen Testverfahren einen Hinweis auf das Vorhandensein des Erregers oder seiner Toxine, alle Ergebnisse waren negativ. In Tabelle 4 sind die weiteren Ergebnisse der übrigen Kultur-positiven Diskrepanten dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse 48 h Kultur, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 48 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|---------------|----------------|-----------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| 41 | + | - | - | + | + | - |
| 100 | + | + | - | - | + | + |
| 152 | + | + | - | + | + | - |
| 175 | + | - | + | + | + | + |
| 204 | + | + | - | + | + | - |
| 238 | + | + | - | + | + | + |
| 266 | + | + | - | - | + | + |
| 267 | + | + | + | + | + | - |
| 294 | + | + | - | + | + | + |
| 301 | + | - | + | + | + | + |

* erstes ELISA aus Stuhlmaterial war negativ, zweites ELISA aus der positiven Kultur brachte ein positives Ergebnis

Neben den Kultur-positiven Proben waren 16 Kultur-negative Proben auffällig. Diese 16 Proben waren einzig in der Kultur negativ und lieferten in allen weiteren Testverfahren ein positives Ergebnis. Ab der Probe Nr. 35 wurden alle, nach 48 h

negativen Kulturen erneut 48 h unter gleichen Bedingungen bebrütet. Nach 96 h Inkubation zeigten 11 Proben ein positives Kultur-Ergebnis, 5 der 11 Proben zeigten auch in allen weiteren Testverfahren ein positives Ergebnis, 3 der übrigen 6 Proben waren einzig in der 96 h Kultur positiv, alle weiteren Ergebnisse waren negativ. In Tabelle 5 wurden die 3 96 h Kultur-positiven Diskrepanten dargestellt.

Tabelle 4: Ergebnisse 96 h Kultur, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 96 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|---------------|----------------|-----------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| 95 | + | - | + | + | - | + |
| 109 | + | - | - | + | + | + |
| 170 | + | - | + | + | + | - |

6.1.2 ELISA zum Nachweis der Toxine TcdA/TcdB

Zusätzlich zur Routinediagnostik des mikrobiologischen Labors des ZfD wurden alle homogenisierten Proben mit Hilfe des RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B-ELISAs auf die Anwesenheit der *C. difficile* Toxine TcdA und TcdB überprüft. Von insgesamt 307, aus dem Stuhlmaterial getesteten Proben wiesen 35 ein positives Ergebnis auf, 27 der Toxin-positiven Proben waren ebenfalls in allen weiteren Testverfahren positiv. Die übrigen 8 Toxin-positiven Proben weisen diskrepante Ergebnisse auf, wobei 7 der 8 Proben einzig ein negatives Kulturergebnis (48 h) lieferten, alle weiteren Testverfahren fielen positiv aus.

Tabelle 5: Ergebnisse Toxin-ELISA, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 48 h | Toxin- ELISA | GDH-ELISA (R- Biopharm) | GDH- ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|--|----------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|
| 43, 107, 108, 130, 222, 241, 260 | - | + | + | + | + | + |
| 238 | + | + | - | + | + | + |

In den Fällen einer Diskrepanz zwischen Kultur und Toxin-ELISA in Form eines Kultur positiven aber Toxin-ELISA negativen Ergebnisses erfolgte eine Toxin Nachtestung direkt aus der positiven Kultur. Unter genannten Bedingungen wurden insgesamt 30 Proben nachgetestet, in 18 Fällen detektierte das ELISA die Toxine aus dem Kulturmateriail. 10 der übrigen 12 Nachtestungen brachten erneut ein Toxin-negatives Ergebnis und wiesen auch in allen weiteren Testverfahren ein negatives Ergebnis auf, lediglich die Kultur wurde positiv gewertet.

Tabelle 6: negative Ergebnisse der Toxin Nachtestung

| Proben Nr. | Kultur 48 h | Toxin- ELISA | GDH-ELISA (R- Biopharm) | GDH- ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|--|----------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|
| 25, 44, 53, 62, 82, 87, 119, 134, 135, 145 | + | - | - | - | - | - |
| 41 | + | - | - | + | + | - |
| 175 | + | - | + | + | + | + |

Anhand der verschiedenen Testverfahren innerhalb dieser Arbeit kommt nur die PCR zum Nachweis der Toxingene tcdA und tcdB als Vergleichstest zur Ermittlung der testspezifischen Ergebnisse in Frage. In Tabelle 8 wurden die Ergebnisse der Toxin-ELISAs direkt aus dem Stuhlmaterial im Vergleich zur Toxin PCR aufgeführt. Aus diesen Ergebnissen resultiert eine Sensitivität von 54 % (Intervall: 43%-64%) und eine

Spezifität von 100 % (Intervall: 99%-100%). Unter Verwendung der Toxin A/B PCR liegt die Prävalenz bei 21%, daraus ergibt sich ein positiver prädiktive Wert (PPV) von 100 % (Intervall: 92%-100%), der negative prädiktive Wert (NPV) liegt bei 89 % (Intervall: 85%-92%).

Tabelle 7: Vergleich des Toxin-ELISAs aus der Stuhlprobe mit der Toxin PCR

| | | Toxin A/B PCR (mit Wdh.) | | total |
|---|---|--------------------------|-----|------------|
| | | + | - | |
| RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B | + | 35 | 0 | 35 |
| | - | 30 | 242 | 272 |
| total | | 65 | 242 | 307 |

Dargestellt in Tabelle 9 ist die Zusammenfassung der Ergebnisse der Toxin-ELISAs direkt aus der Stuhlprobe sowie der Nachtestung aus der Kultur im Vergleich mit den Ergebnissen der Toxin-PCR. Aufgrund der eingerechneten Nachtestung kommen folgende Ergebnisse zustande, eine Sensitivität von 75 % (Intervall: 65%-84%) und eine Spezifität von 98 % (Intervall: 96%-99%). Der PPV liegt bei 92 % (Intervall: 84%-97%) und der NPV bei 94 % (Intervall: 91%-96%).

Tabelle 8: Vergleich des Toxin-ELISAs (Ergebnisse der Nachtestung einbezogen) mit der Toxin PCR

| | | Toxin A/B PCR (mit Wdh.) | | total |
|--|---|--------------------------|-----|------------|
| | | + | - | |
| RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B (mit Nachtestung) | + | 49 | 4 | 53 |
| | - | 16 | 238 | 254 |
| total | | 65 | 242 | 307 |

6.1.3 ELISA zum Nachweis der *C. difficile* spezifischen GDH

Zum Nachweis von *C. difficile* Bakterien in Stuhlmaterial wurden innerhalb dieser Arbeit 2 Verfahren angewendet welche das gleiche Ziel verfolgen, die Detektion der *C. difficile* spezifischen GDH. Das Immunassay der Firma R-Biopharm durchlief die erste externe Testung in einem Routinelabor, das Immunassay von TECHLAB ist bereits kommerziell erhältlich und wurde als Konkurrenzprodukt verwendet um einen Vergleich zu ziehen. Die Abbildung 12 zeigt einen Teil einer Mikrotiterplatte (MTP), zwei Reihen der MTP sind mit Wells bestückt. Well A1 zeigt eine auffällig dunkelgelbe Färbung der mitgeführten Positivkontrolle (PC) mit einer optischen Dichte (OD) von 3,538 bei 450 nm gemessen. Das Well B1 weist keine Verfärbung auf, die Lösung ist transparent. Es handelt sich um die mitgeführte Negativkontrolle (NC) mit einer OD von 0,004 bei 450 nm gemessen. Die Wells C1-C2 enthalten die Patientenproben 134-142, alle übrigen, blau markierten Wells komplettieren den Streifen und sind leere Einheiten. Die Wells F1 und G1 zeigen ein positives GDH-Ergebnis, alle weiteren Proben sind GDH-negativ.

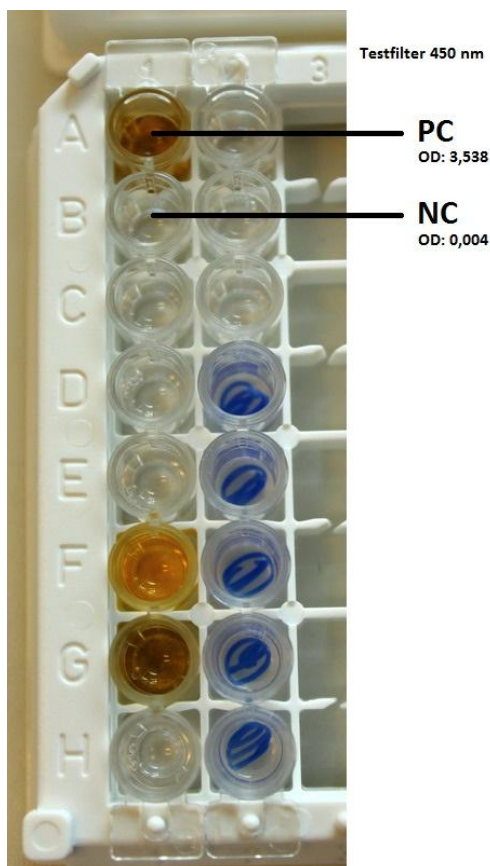


Abbildung 14: GDH-ELISA (R-Biopharm), Proben 134-142

RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH, R-Biopharm

Unter Verwendung des GDH-ELISAs von R-Biopharm wurden 59 positive Ergebnisse erzielt, 38 der GDH-positiven Proben wiesen auch in allen weiteren Testverfahren ein positives Ergebnis auf. Die übrigen 21 GDH-positiven Proben lieferten diskrepante Ergebnisse, 7 der 21 Proben zeigten ein Kultur negatives Ergebnis, sind jedoch in allen weiteren Verfahren positiv bewertet. Weitere 2 GDH-positive zeigten ein positives Ergebnis in allen Testverfahren außer dem Toxin-ELISA. Auch die Kombination einer negativen Kultur sowie des negativen Toxin-ELISAs mit positiven Werten aller übrigen Verfahren war in 9 Fällen zu beobachten. Die Zusammenfassung der Diskrepanzen ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 96 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|---|----------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| 43, 107, 108, 130, 222, 241, 260 | - | + | + | + | + | + |
| 175, 301 | + | - | + | + | + | + |
| 1, 32, 70, 76, 120, 121, 216, 218, 256 | - | - | + | + | + | + |
| 170 | - | - | + | + | + | - |
| 95 | - | - | + | + | - | + |
| 267 | + | + | + | + | + | - |

Die testspezifischen Werte des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs wurden zum einen mit a) der Kultur als Referenz berechnet und zum anderen mit b) der 16S rDNA als Referenz ermittelt. Mit a) der Kultur als Referenz erreicht das Immunassay eine Sensitivität von 69 % (Intervall: 58 %-79 %) und eine Spezifität von 93 % (Intervall: 89 %-95 %). PPV und NPV berechnen sich anhand einer Prävalenz von 19%, es ergeben sich Werte von 69% (Intervall: 58%-79%) und 93% (Intervall: 89%-95%). Deutlich höhere Werte wurden mit b) der 16S rDNA PCR als Referenz ermittelt.

Die Sensitivität liegt hier bei 86 % (Intervall: 76 %-94%) und die Spezifität bei 99 % (Intervall: 97 %-100 %). Mit einem Prävalenzwert von 21% liegt der PPV bei 97 % (Intervall: 88%-100%) und der NPV bei 96 % (Intervall: 93%-98%).

Tabelle 10: Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISAs mit den Referenzen a) Kultur und b) 16S rDNA PCR

| | | a) 48 h Kultur | | b) 16S rDNA PCR | |
|---------------------------|---|----------------|-----|-----------------|-----|
| | | + | - | + | - |
| RIDASCREEN® | + | 41 | 18 | 57 | 2 |
| Clostridium difficile GDH | - | 18 | 230 | 9 | 239 |

Wampole® C. DIFF CHEK™ - 60, TECHLAB®

Als kommerzielles Konkurrenzprodukt wurde das Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISA des Herstellers TECHLAB als Testverfahren in der Arbeit mitgeführt. Dieses Immunassay zum Nachweis der *C. difficile* spezifischen GDH detektierte in 69 Fällen das „common“ Antigen. Insgesamt 38 der 69 GDH-positiven Proben zeigten auch in allen weiteren Testverfahren ein positives Ergebnis. Vergleichbar mit den Ergebnissen des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs ist auch hier auffällig, dass 9 der 31 GDH-positiven Proben in allen weiteren Testverfahren positive Ergebnisse liefern aber Kultur-negativ sowie Toxin-ELISA-negativ sind. Desweiteren sind 7 der GDH-positiven Proben Kultur-negativ, alle weiteren Testverfahren liefern ebenfalls ein positives Ergebnis. Alle diskrepanten Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISA, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 96 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|-------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| 43, 107, 108, 130, 222, 241, 260 | - | + | + | + | + | + |
| 175, 301 | + | - | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 204, 238, 294 | + | + | - | + | + | + |
| 1, 32, 70, 76, 120, 121, 216, 218, 256 | - | - | + | + | + | + |
| 61, 65, 91, 206 | - | - | - | + | - | - |
| 41 | + | - | - | + | + | - |
| 95 | - | - | + | + | - | + |
| 109 | - | - | - | + | + | + |
| 152 | + | + | - | + | + | - |
| 170 | - | - | + | + | + | - |
| 267 | + | + | + | + | + | - |

Identisch zur Auswertung des Immunassays der Firma R-Biopharm wurden die testspezifischen Werte des Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISAs einmal mit a) der Kultur als Referenz berechnet und desweiteren mit b) der 16S rDNA als Referenz ermittelt. Im Vergleich mit a) der Kultur als Referenz erzielt das Immunassay eine Sensitivität von 78 % (Intervall: 67 %-86 %) und eine Spezifität von 91 % (Intervall: 87 %-94 %). Mit einem Prävalenzwert von 19% ordnet sich der PPV bei 67 % (Intervall: 56%-76%) und der NPV bei 95 % (Intervall: 91%-97%) ein. Ebenfalls erkennbar sind höhere Werte bei der Verwendung b) der 16S rDNA PCR als Referenz. Die Sensitivität liegt bei 95 % (Intervall: 87 %-99%) und die Spezifität bei 98 % (Intervall: 95 %-99 %). Der PPV erreicht einen Wert von 91 % (Intervall: 82%-97%) und der NPV einen Wert von 99 % (Intervall: 96%-100%) unter Beachtung einer Prävalenz von 21 %.

Tabelle 12: Vergleich des Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISAs mit den Referenzen a) Kultur und b) 16S rDNA PCR

| | | a) 48 h Kultur | | b) 16S rDNA PCR | |
|--------------------------------|---|----------------|-----|-----------------|-----|
| | | + | - | + | - |
| Wampole® C.DIFF CHEK™-60 | + | 46 | 23 | 63 | 6 |
| | - | 13 | 225 | 3 | 235 |

6.1.4 real-time PCR

Zusätzlich zu den mikrobiologischen Diagnostiktools wurde ein molekularbiologisches Verfahren in Form einer kombinierten real-time PCR angewendet. Das Kit der Firma R-Biopharm, RIDA[®] GENE Clostridium difficile & Toxin A/B V, enthält zum einen den Mastermix (MM) zur Detektion der Toxingene tcdA und tcdB und zum anderen einen MM zum Nachweis der *C. difficile* Erreger anhand der 16S rDNA, unabhängig von der Toxinproduktion. Beide PCR-Verfahren wurden im Regelfall (Wiederholungsläufe ausgeschlossen) parallel abgearbeitet.

Detektion der *C. difficile* spezifischen 16S rDNA

Mit Hilfe der Anwendung der 16S rDNA real-time PCR wurde in 66 Proben das *C. difficile* Bakterium detektiert, 38 der 66 PCR-positiven Proben wiesen ebenfalls in allen weiteren Testverfahren einen positiven Ausgang auf. Alle weiteren 28 PCR-positiven Proben liefern diskrepante Werte welche in Tabelle 14 dargestellt sind. Auch hier sind Kultur-negative (7), Toxin-ELISA-negative (2) beziehungsweise Kultur-negative und Toxin-ELISA-negative Proben (9), welche in allen weiteren Verfahren ein positives Ergebnis liefern auffällig.

Tabelle 13: Ergebnisse 16S rDNA PCR, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 48 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|---|----------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| 43, 107, 108, 130, 222, 241, 260 | - | + | + | + | + | + |
| 175, 301 | + | - | + | + | + | + |
| 204, 238, 294 | + | + | - | + | + | + |
| 1, 32, 76, 70, 120, 121, 216, 218, 256 | - | - | + | + | + | + |
| 6 | - | - | - | - | + | + |

| | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|
| 41 | + | - | - | + | + | - |
| 109 | - | - | - | + | + | + |
| 139 | - | - | - | - | + | + |
| 152 | + | + | - | + | + | - |
| 170 | - | - | + | + | + | - |
| 267 | + | + | + | + | + | - |

Unter Verwendung der Ergebnisse der 48 h Kultur als Referenzmethode erzielt die 16S rDNA PCR eine Sensitivität von 78 % (Intervall: 67%-86%) und eine Spezifität von 92 % (Intervall: 88%-95%). Der PPV ordnet sich bei 70 % (Intervall: 59%-79%) ein, der NPV liegt bei 95 % (Intervall: 91%-97%).

Tabelle 14: Vergleich des 16S rDNA PCR (mit Wdh.) mit der 48 h Kultur

| | | Kultur 48 h | | total |
|-------------------------|---|-------------|-----|------------|
| | | + | - | |
| 16S rDNA PCR (mit Wdh.) | + | 46 | 20 | 66 |
| | - | 13 | 228 | 241 |
| total | | 59 | 248 | 307 |

Detektion der *C. difficile* spezifischen Toxingene tcdA und tcdB

Neben der Methode des Toxin Nachweises mit Hilfe eines Immunassays wurden die Proben zusätzlich mit einer real-time PCR zur Detektion der Toxingene tcdA und tcdB untersucht. Die PCR ermittelte ein Ergebnis von 65 Toxin-positiven Proben, 38 dieser Proben lieferten auch in allen weiteren Testverfahren ein positives Ergebnis. Ebenfalls interessant ist das Ergebnis von 2 Toxin-PCR-positiven Proben welche ausschließlich in beiden PCR-Verfahren positive Werte lieferten, in allen weiteren Tests jedoch negativ gewertet wurde.

Tabelle 15: Ergebnisse Toxin-PCR, Diskrepante

| Proben Nr. | Kultur 48 h | Toxin- ELISA | GDH- ELISA (R- Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR | tcdA/tcdB PCR |
|---|----------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| 43, 107, 108, 130, 222, 241, 260 | - | + | + | + | + | + |
| 175, 301 | + | - | + | + | + | + |
| 204, 238, 294 | + | + | - | + | + | + |
| 1, 32, 70, 76, 120, 121, 216, 218, 256 | - | - | + | + | + | + |
| 6, 139 | - | - | - | - | + | + |
| 54 | + | - | - | + | + | - |
| 95 | - | - | + | + | - | + |
| 100 | + | + | - | - | - | + |
| 109 | - | - | - | + | + | + |

Bei Verwendung der Ergebnisse a) des Toxin-ELISAs aus dem Stuhlmaterial ergeben sich folgende Kennzahlen für die Toxin-PCR, eine Sensitivität von 100 % (Intervall: 92%-100%) und eine Spezifität von 89 % (Intervall: 85%-92%). Aus den Ergebnissen resultiert ein Prävalenzwert von 11%, ein PPV von 54 % (Intervall: 43%-64%) und ein NPV von 100 % (Intervall: 99%-100%). Unter Einrechnung der Ergebnisse der Toxin-ELISA Nachtestungen aus der Kultur erreicht die Toxin-PCR eine Sensitivität von 92 % (Intervall: 84%-97%) und eine Spezifität 94 % (Intervall: 91%-96%). Die Werte für den PPV und den NPV liegen in Abhängigkeit von einer Prävalenz von 17% bei 75 % (Intervall: 65%-84%) beziehungsweise bei 98 % (Intervall: 96%-99%).

Tabelle 16: Vergleich der Toxin-PCR mit den Referenzen a) Toxin-ELISA aus Stuhlmaterial und b) Toxin-ELISA inc. Der Nachtestungen aus der Kultur

| | | a) Toxin-ELISA aus Stuhlmaterial | | b) Toxin-ELISA inc. Nachtestung aus Kultur | |
|----------------------|---|----------------------------------|-----|--|-----|
| | | + | - | + | - |
| Toxin PCR (mit Wdh.) | + | 35 | 30 | 49 | 16 |
| | - | 0 | 242 | 4 | 238 |

6.1.5 Alters- und Geschlechterverteilung

Die Auswahl der Proben innerhalb dieser Arbeit wurde nicht vom Geschlecht der Patienten abhängig gemacht. Lediglich ein Kriterium bezüglich des Alters der Patienten wurde im Vorfeld festgelegt. Es wurden keine Proben von Neugeborenen und Säuglingen in die Untersuchung aufgenommen. In Abbildung 13 ist die Altersverteilung aller 307 Patienten graphisch dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten mit einer Anforderung auf eine *C. difficile* Untersuchung im mikrobiologischen Labor der ZfD Chemnitz lag innerhalb dieser Arbeit bei 69 Jahren. Auffällig ist der sukzessive Anstieg der Untersuchungszahlen innerhalb der Altersspanne von 2-71 Jahren. Ein deutliches Maximum der angeforderten Untersuchungen liegt bei Patienten im Alter von 71-80 Jahren. Bei den jüngsten Patienten handelt es sich um ein einjähriges Mädchen und einen zweijährigen Jungen. Alle Testergebnisse der beiden Kinder lieferten negative Werte.

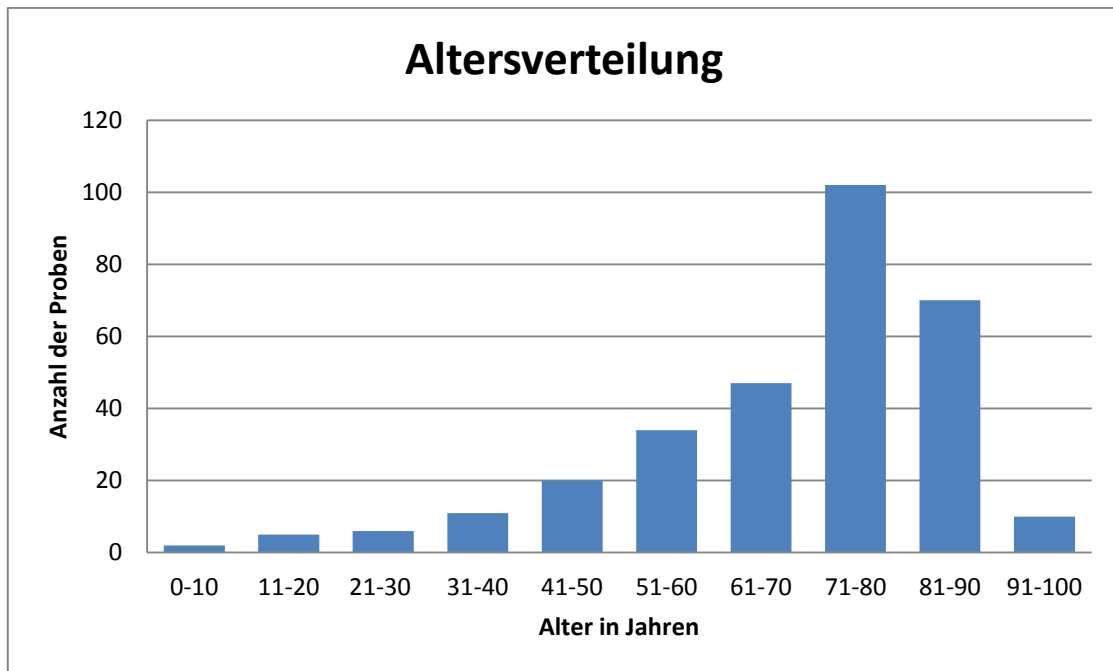


Abbildung 15: Altersverteilung der 307 Patienten

Bei der Geschlechterverteilung der Patienten in Abbildung 14 zeichnet sich ein interessantes Bild ab, 155 der 307 untersuchten Stuhlproben stammten von männlichen Patienten (50,5 %), weitere 152 Proben kamen von weiblichen Patienten (49,5 %). Innerhalb der Altersspanne von 1-70 Jahren dominiert die Anzahl der Untersuchungen männlicher Patienten, diese Relation dreht sich ab einem Alter von 81 Jahren.

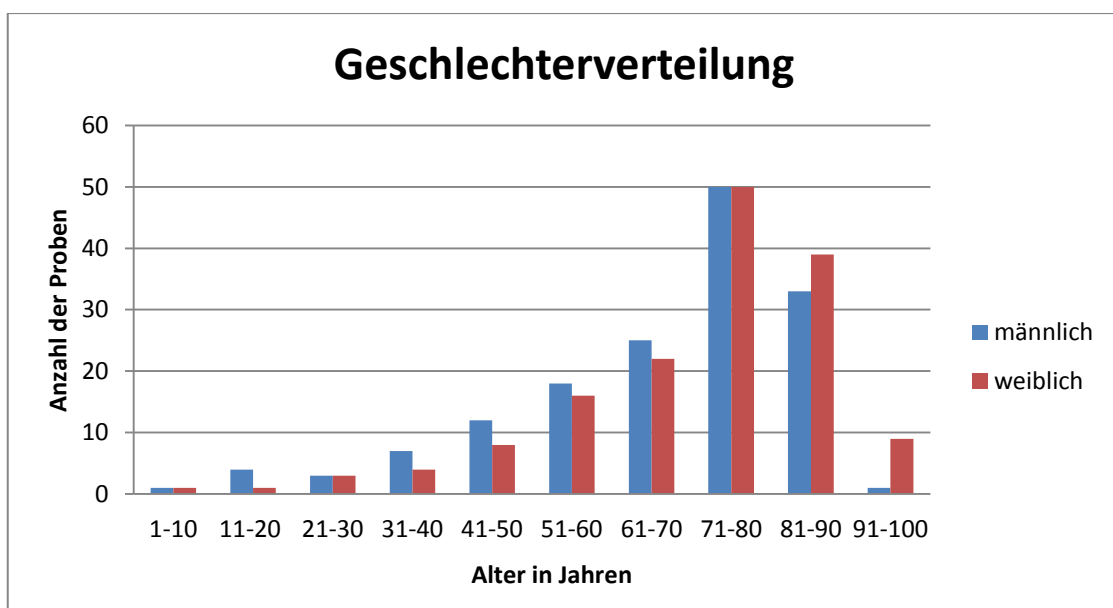


Abbildung 16: Geschlechterverteilung im Studienkollektiv (n=307), zusammengesetzt aus 155 Männern und 152 Frauen

6.2 Evaluierung des Antigen ELISAs

Ein Teil dieser Arbeit ist die Evaluierung eines Immuassays der Firma R-Biopharm zur Detektion des „common Antigens“, RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH. Um ein aussagekräftiges Urteil abzugeben wurde das neue Verfahren auf dessen Reproduzierbarkeit getestet sowie ein Vergleich mit einem kommerziellen Konkurrenz-ELISA durchgeführt.

6.2.1 Reproduzierbarkeitsstudie

Zur Evaluierung des Immunassays der Firma R-Biopharm, RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH, und dem anschließenden Vergleich mit dem Assay eines konkurrierenden Herstellers (TECHLAB) wurde im ersten Schritt die Reproduzierbarkeit des neuen Produktes getestet. Die Ergebnisse für die Intra-Assay/Inter-Assay Reproduzierbarkeit sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 17: Ergebnisse der Intra-/Inter-Assay Reproduzierbarkeit der Pilotcharge 1

| Referenzproben | Intra-Assay | Inter-Assay |
|----------------|---------------|---------------|
| Mittelwert/VK | Kit Lot 1 | Kit Lot 1 |
| 1 | 2,392/10,87% | 2,392/12,28% |
| 2 | 1,434/7,65% | 1,434/11,70% |
| 3 | 0,562/23,07% | 0,562/23,07% |
| 4 | 0,518/17,26% | 0,518/19,68% |
| 5 | 0,192/20,79% | 0,192/21,60% |
| 6 | 0,003/108,58% | 0,003/108,58% |

6.2.2 Vergleich des GDH-ELISA mit einem kommerziellen Konkurrenz-ELISA

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs gegenüber kommerziellen Verfahren mit gleicher Methodik wurde ein Konkurrenz-ELISA der Firma TECHLAB in der Testserie mitgeführt. Verwendete Proben wurden nach Herstellerangaben aufgearbeitet, die Abarbeitung beider Verfahren erfolgte parallel mit Hilfe eines ELISA-Vollautomaten (DSX™, Dynex), welcher die

herstellerspezifischen schnell-Programme für beide ELISAs anwendete. Anhand folgender Tabellen sind die Vergleichswerte für beide Verfahren dargestellt. Als Referenz dient in der Mikrobiologie üblicherweise die Kultur, als zusätzliche Referenz wurde die PCR zum Nachweis der 16S rDNA aufgeführt.

Tabelle 18: Ergebnisse des RIDASCREEN Clostridium difficile GDH-ELISAs im Vergleich mit Referenz a) Kultur und Referenz b) der PCR zum Nachweis der 16S rDNA

| | | a) Kultur | | b) PCR | |
|---|---|-----------|-----|--------|------|
| | | + | - | + | - |
| RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH | + | 41 | 18* | 57 | 2*** |
| | - | 18** | 230 | 9**** | 239 |

* 16 Proben zeigten ein negatives Kulturergebnis, in allen weiteren Tests waren diese Proben positiv

** 11 Proben zeigten ein positives Kulturergebnis, in allen weiteren Tests waren diese Proben negativ

*** 1 Probe zeigte ein negatives PCR (16S rDNA) Ergebnis, in allen weiteren Tests war diese Probe positiv

**** 2 Proben zeigten in beiden PCR Verfahren ein positives Ergebnis, in allen weiteren Tests waren diese Proben negativ

Tabelle 19: Ergebnisse des Konkurrenz-ELISAs im Vergleich mit Referenz a) Kultur und Referenz b) der PCR zum Nachweis der 16S rDNA

| | | a) Kultur | | b) PCR | |
|----------------------|---|-----------|-----|--------|-----|
| | | + | - | + | - |
| Konkurrenz- ELISA | + | 46 | 23* | 63 | 6 |
| | - | 13** | 225 | 3*** | 235 |

* 16 Proben zeigten ein negatives Kulturergebnis, in allen weiteren Tests waren diese Proben positiv

** 11 Proben zeigten ein positives Kulturergebnis, in allen weiteren Tests waren diese Proben negativ

*** 2 Proben zeigten ein positives PCR (16S rDNA) Ergebnis, in allen weiteren Tests war diese Proben negativ

Tabelle 20: Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs mit einem Konkurrenz-ELISA

| | RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH | Konkurrenz- ELISA | RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH | Konkurrenz- ELISA |
|--------------|---|----------------------|---|----------------------|
| | Referenz: Kultur | | Referenz: PCR-16S rDNA | |
| Sensitivität | 69% (58%-79%) | 78% (67%-86%) | 86% (76%-94%) | 95% (87%-99%) |
| Spezifität | 93% (89%-95%) | 91% (87%-94%) | 99% (97%-100%) | 98% (95%-99%) |
| PPV | 69% (58%-79%) | 67% (56%-76%) | 97% (88%-100%) | 91% (82%-97%) |
| NPV | 93% (89%-95%) | 95% (91%-97%) | 96% (93%-98%) | 99% (96%-100%) |
| Effizienz | 88% | 88% | 96% | 97% |

6.2.3 Vergleich der Ergebnisse der Pilotchargen 1, 2 und 3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISAs

Aufgrund der Ergebnisse der Pilotcharge 1, welche innerhalb der Studie zum Einsatz kam, hat der Hersteller versucht das Testverfahren weiter zu optimieren. Dabei wurde eine zweite und dritte Pilotcharge entwickelt. Der Unterschied zwischen den Chargen steht im Zusammenhang mit Veränderungen des Biotinylierungsprotokolls sowie der Dialyse der Konjugate. Genauere Informationen können aufgrund des Betriebsgeheimnisses natürlich nicht preisgegeben werden.

**Tabelle 21: Übersicht der Leistungsdaten der Pilotchargen 1, 2 und 3 des RIDASCREEN®
Clostridium difficile GDH-ELISAs**

| | Pilotcharge 1 | Pilotcharge 2 | Pilotcharge 3 |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| Sensitivität | 86% (76%-94%) | 91% (81%-97%) | 89% (79%-96%) |
| Spezifität | 99% (97%-100%) | 99% (97%-100%) | 99% (97%-100%) |
| PPV | 97% (88%-100%) | 97% (89%-100%) | 97% (89%-100%) |
| NPV | 96% (93%-98%) | 98% (95%-99%) | 97% (94%-99%) |
| Effizienz | 96% | 97% | 97% |

Die entnommenen Leistungsdaten wurden unter Verwendung der 16S rDNA PCR als Referenzmethode berechnet. PPV und NPV-Werte wurden mit dem einheitlichen Prävalenzwert von 21% bestimmt.

7 Diskussion

7.1 Vergleich der diagnostischen Methoden

Der Vergleich der verschiedenen mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungsverfahren wurde durchgeführt um sich einen Überblick der Leistungsdaten der einzelnen Methoden innerhalb eines einheitlichen Probenkollektivs von 307 Proben zu verschaffen. Ebenso sollten die Ergebnisse eine Aussage über die Qualität der Routinediagnostik der mikrobiologischen Abteilung der ZfD GmbH Chemnitz liefern. Zu Beginn der Arbeit bestand die Routinediagnostik aus einer 48 h Kultivierung direkt aus dem Stuhlmaterial ohne Sporens Selektion auf Selektivagarplatten von Biomeri  x (CLO-90) und einer Toxin-Detektion unter Verwendung eines Immunassays der Firma R-Biopharm (RIDASCREEN^{  } Clostridium difficile Toxin A/B). Bei diskrepanten Ergebnissen in Form einer positiven Kultur und eines negativen Toxin-ELISAs wurde die Toxin-Detektion aus der Kultur wiederholt. Da die Kultur aufgrund ihrer Sensitivität in der Mikrobiologie üblicherweise als Goldstandard gilt wurden innerhalb dieser Arbeit keine Leistungsdaten unter Einsatz einer Referenz ermittelt. Die 48h Kultur zeigte in 59 Fällen ein positives Wachstum. Besonders auffällig waren 11 Kultur-positive Proben (18,6% der Kultur-Positiven), welche in allen weiteren Testverfahren einen negativen Wert erzielten. Diese Zahl lässt auf einen hohen Anteil falsch-positiver Kultur-Ergebnisse in der Auswertung schließen. Ein Grund dafür ist der menschliche Faktor, die subjektive Einschätzung aufgrund unterschiedlicher Erfahrungswerte der Mitarbeiter bei der Beurteilung der Kulturen. Dem Zeit- und Organisationsaufwand zu Schulden wurde in den seltensten Fällen eine gram-Färbung mit anschließender mikroskopischer Beurteilung fragwürdiger Kulturen durchgeführt. Ein weiterer Faktor ist die Art der Abarbeitung, auf einem Nährboden wurden stets zwei Proben der laufenden Nummer ausplattiert. Folglich konnten die Kulturen nur erschwert an dem für *C. difficile* typischen „Pferdestall“-Geruch identifiziert werden. Desweiteren bestand die Gefahr der Verspritzung der Proben auf der Agarplatte was das Ergebnis empfindlich beeinflusst. Der Verdacht einer solchen Kontamination besteht bei Probe Nr. 292 welche mit der stark positiven Probe Nr. 291 zusammen auf einem Nähragar

ausplattiert wurde. In der Tabelle 21 sind die Ergebnisse beider Proben dargestellt. Auf dem Nährmedium präsentierte sich die Probe 292 in einer Mischkultur kleiner Kolonien, nah an der gedachten Trennlinie zur Probe 291 wuchs eine einzelne Kolonie typischer *C. difficile* Morphologie. Die Plattenhälfte der Probe 291 war dicht mit *C. difficile* bewachsen. Zusätzlich passen die Testergebnisse zu dieser Vermutung, die Kultur wurde aufgrund der einzelnen Kolonie positiv gewertet, das Toxin-ELISA aus dem Stuhlmaterial ist klar negativ aber das Toxin-ELISA aus der Kultur weist einen positiven Wert auf. Auch beide PCR Verfahren lieferten ein eindeutiges Ergebnis.

Tabelle 22: Ergebnisse der Proben Nr. 291 und 292, Verdacht auf Kontamination durch Verspritzung auf der Agarplatte

| Proben Nr. | Kultur 48h | Toxin-ELISA aus Probe | Toxin-ELISA aus Kultur | GDH-ELISA (R-Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR/Tox. PCR |
|------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| 291 | + | OD 1,018 | - | OD 3,6 | OD 3,292 | 27,01/29,57 |
| 292 | + | OD 0,003 | OD 1,347 | OD 0,003 | OD 0,021 | -/- |

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich aus der variierenden Konsistenz des Probenmaterials. Die Palette der Beschaffenheit der Proben reichte von flüssigem über schleimig/flüssiges bis hin zu leicht formbarem Stuhlmaterial. Gerade schleimige Proben ließen sich schlecht ausplattieren. Die Probe Nr. 43 war ein schönes Beispiel für einen solchen Fall. Wie Tabelle 23 zeigt waren alle Testergebnisse deutlich positiv, lediglich die 48h Kultur zeigte keinerlei Wachstum. Nach einer zweiten Beurteilung nach 96h Inkubation waren *C. difficile* typische Kolonien am Rand des dünnen Schleimfilms auf der Agarplatte zu sehen.

Tabelle 23: Ergebnis der Probe Nr. 43, schleimige Konsistenz, positives Kultur-Ergebnis nach 96 h

| Proben Nr. | Kultur 48h/96h | Toxin-ELISA aus Probe | Toxin-ELISA aus Kultur | GDH-ELISA (R-Biopharm) | GDH-ELISA (TECHLAB) | 16S rDNA PCR/Tox. PCR |
|------------|----------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| 43 | -/+ | OD 0,881 | - | OD 3,6 | OD 3,346 | 25,06/27,44 |

Leicht getrübbte, wässrige Stuhlproben hinterließen oft ein geringes, teilweise auch kein Bakterienwachstum auf den Nährböden. Ein schönes Wachstum war oft bei flüssig/breiigen Stühlen zu beobachten, diese Konsistenz war am häufigsten vertreten. Die Ergebnisse der Kultur standen aufgrund der Inkubationsdauer zuletzt fest. Alle weiteren Testverfahren lieferten zu diesem Zeitpunkt bereits einen Überblick über die jeweiligen Proben. So fiel rechtzeitig auf, dass die Kultur zeitweise als einziges Testverfahren ein negatives Ergebnis aufwies. Aus diesem Grund wurden ab Probe Nr. 35 alle, nach der ersten Beurteilung negativen Proben (48h) weitere 48h unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die zweite Beurteilung brachte ein Ergebnis von 11 positiven Kulturen nach 96 h Bebrütung. In drei Fällen deutete kein weiteres Testverfahren auf den Erreger in der Probe hin. Vermutlich erschwerte die Bedingung der Doppelnutzung der Agarplatten auch hier die Beurteilung, da zwei der drei Proben das Nährmedium je mit einer stark positiven Kultur teilten. Zusammenfassend ist der Anteil der falsch positiven und falsch negativen Kultur-Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit in Zusammenhang mit verschiedenen Einflussfaktoren, entgegen der Literatur, nicht zufriedenstellend [Delmée et al., 2005; Rousseau et al., 2010]. Mit einem Zeitaufwand von ca. 50 Stunden ist die Kultivierung der Erreger recht langwierig im Vergleich zu anderen Methoden. Unabhängig von den Kulturergebnissen erfolgte die Toxin Detektion aus dem Stuhlmaterial. Das ELISA (RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B, R-Biopharm) wies in 35 Proben die spezifischen Toxine TcdA/TcdB nach. In Anbetracht der Tatsache, dass die verwendete Kultur keine Aussage über die Toxinproduktion positiver Kolonien zulässt, kam nur die real-time PCR zur Detektion der Toxingene als Referenz in Frage. Das ELISA erzielte mit 100 % eine sehr gute Spezifität, es gab keine falsch positiven Ergebnisse. Mit einer Sensitivität von 54% (Intervall: 43%-64%) fiel dieses Testverfahren nicht zufriedenstellend aus. Von 65 PCR-positiven Proben detektierte das ELISA gerade einmal 53,8% (n=35). Wie anfänglich geschildert, erfolgte im Zusammenhang mit diskrepanten Kulturergebnissen eine Wiederholung des ELISAs aus der Kultur. Unter Einrechnung dieser Werte erreichte das ELISA deutlich bessere Ergebnisse in der Sensitivität, 75% (Intervall: 65%-84%). Die Spezifität sank um 2% (98%, Intervall: 96%-99%). Bei einer gleichbleibenden Prävalenz von 21% zeigen die PPV/NPV-Werte ein realistischeres Ergebnis von 92% (84%-97%) und 94% (91%-96%). Verschiedene

Studien beschreiben ähnliche Ergebnisse und raten von einem Toxin-ELISA als allein stehende diagnostische Methode zur Detektion toxigener *C. difficile* Stämme aufgrund niedriger Sensitivität ab [Delmée et al., 2005; Eastwood et al., 2009a; Kawada et al., 2011; Brown et al., 2011]. Die ermittelten Daten bestätigen die Empfehlungen zur Nutzung des Toxin-ELISAs aus der Literatur. Auch innerhalb dieser Arbeit erwies sich eine Kombination der *C. difficile* Kultur unter Verwendung eines Selektivnährmediums mit einem Toxin-ELISA als erfolgreicherer Algorithmus. Ebenfalls in Frage für eine spätere Kombination mit dem Toxin-ELISA kommt das Antigen-ELISA zum Nachweis *C. difficile* spezifischer GDH. Zur Untersuchung der Proben wurde einmal das RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-Assay von R-Biopharm und das Wampole® C. DIFF CHEK™ - 60- Assay des Herstellers TECHLAB verwendet. In den Ergebnissen wurde neben der Kultur die 16S rDNA-PCR als Referenzmethode aufgeführt. Diese Entscheidung geht mit dem enttäuschenden Ergebnis der Kulturmethode innerhalb dieser Arbeit einher. Wie in Tabelle 10 und 12, unter Punkt 6.1.3 der Ergebnisdarstellung aufgeführt zu erkennen ist, ist der Großteil der diskrepanten Ergebnisse auf ein negatives Kultur- beziehungsweise ein negatives Kultur- und Toxin ELISA-Ergebnis zurückzuführen. Das R-Biopharm-Assay zeigt deutlich bessere Sensitivitäts- und Spezifitäts-Werte von 86% (Intervall: 76%-94%) und 99% (Intervall: 97%-100%) unter Verwendung der 16S rDNA-PCR als Referenz. Wir sprechen von einer Verbesserung von +17% in der Sensitivität und +6% in der Spezifität. Besonders Auffällig ist die Veränderung der Vorhersagewerte, der PPV beträgt gerade einmal 69% (Intervall: 58%-79%) mit der Kultur (Prävalenz: 19%) als Referenz und 97% (Intervall: 88%-100%) mit der 16S rDNA-PCR (Prävalenz: 21%). Ähnlich sieht der Sachverhalt bei dem GDH-ELISA der Firma TECHLAB aus, was die Zweifel an der Eignung der Kultur als Referenzmethode in dieser Arbeit untermauert. Mit einem Sensitivitäts-Ergebnis von 95% (Intervall: 87 %-99%) und einem Spezifitäts-Ergebnis von 98% (Intervall: 95 %-99 %) ist eine Verbesserung von +17% beziehungsweise +7% gegenüber den Ergebnissen mit der Kultur als Referenzmethode zu verzeichnen. Der PPV verbesserte sich ebenfalls deutlich von 67% (Intervall: 56%-76%) auf 91% (Intervall: 82%-97%), Prävalenz-Werte wie oben beschrieben. Wie auch oft in der Literatur beschrieben zeichnen sich beide GDH-ELISAs durch eine hohe Spezifität sowie gute PPV/NPV-Werte aus [Eastwood et al., 2009a; Wren et al., 2009;

Brown et al., 2011]. In Bezug auf den zeitlichen und finanziellen Aufwand stehen die ELISA-Verfahren recht gut da. Die ersten Ergebnisse erhält man schon nach 1-2 Stunden. Treten keine diskrepanten Ergebnisse auf, können positive oder negative Werte schnell an den behandelnden Arzt übermittelt werden. Eine schnelle und zuverlässige Diagnostik ist natürlich wünschenswert um unverzüglich mit der geeigneten Therapie zu beginnen beziehungsweise anderen möglichen Ursachen einer Erkrankung auf den Grund zu gehen. Als Vergleich zu den mikrobiologischen Diagnostik-Tools ging die kombinierte real-time PCR als molekularbiologisches Untersuchungsverfahren ins Rennen. Die 16S rDNA-PCR zur Detektion des Erregers selbst, erreichte mit der Kultur als Referenzmethode eher enttäuschende Werte für Sensitivität und Spezifität von 78 % (Intervall: 67%-86%) beziehungsweise 92 % (Intervall: 88%-95%). Wie schon geschildert, hängen diese schlechten Werte mit den Kultur-Ergebnissen zusammen welche nicht zufrieden stellend ausfielen. Etwas besser schnitt die PCR zur Detektion der Toxingene *tcdA* und *tcdB* mit Werten von 92 % (Intervall: 84%-97%) und 94 % (Intervall: 91%-96%) ab, die gewählte Referenzmethode war hier das Toxin-ELISA unter Einrechnung der Werte aus den Nachuntersuchungen aus der Kultur. In wenigen Fällen kamen beide PCR-Verfahren an ihre Nachweisgrenze.

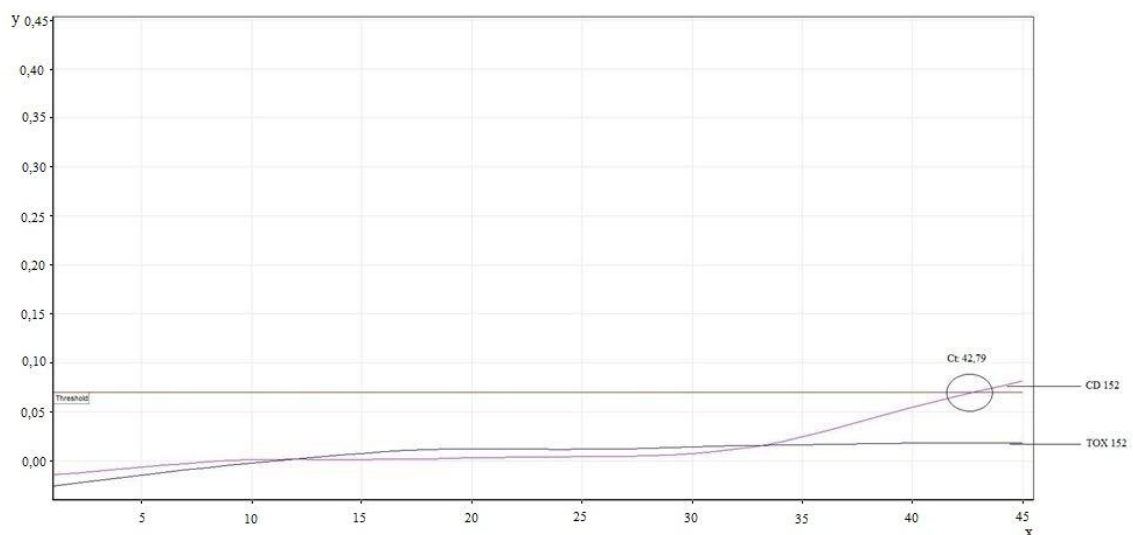


Abbildung 17: Kurvenverlauf der Probe 152, Quantitation Analysis

Achsenbeschriftung/Bezeichnungen: y-Achse: Fluoreszenz-Signal, x-Achse: Anzahl der Zyklen, Die Kurve CD 152 zeigt eine schwache Detektion der gesuchten 16S rDNA an, die Toxin-PCR ist negativ da kein Signal sichtbar ist.

Die Abbildung 17 zeigt den Kurvenverlauf der Probe 152, die Kurve des *C. difficile* Nachweises geht sehr spät in den Anstieg über. Mit 42,79 ist der Ct-Wert als sehr hoch einzustufen, was auf eine niedrige Konzentration der gesuchten Gensequenz in der Ausgangslösung hindeutet. Ebenso könnte eine Kontamination der Grund für den hohen Ct-Wert sein, dagegen sprechen die weiteren Ergebnisse dieser Probe: Kultur positiv, Toxin-ELISA positiv, GDH-positiv.

Beide PCR-Verfahren sind unter genauer Analyse der Daten im Rahmen dieser Arbeit die sensibelsten Nachweismethoden für den Erreger selbst sowie dessen Toxingene *tcdA* und *tcdB*. Trotzdem ist die PCR als diagnostisches Mittel der Wahl wenig verbreitet. Ausschlaggebend dafür sind unter anderem hohe Investitionskosten für die Anschaffung der sensiblen Technik sowie teurere Untersuchungskosten. Dem entgegen steht jedoch eine schnelle und sehr sichere Diagnostik.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle Methoden ihre Stärken und Schwächen haben. In jedem Fall sollte eine Kombination sehr sensitiver und sehr spezifischer Verfahren gewählt werden, keine Methode sollte als alleinstehendes, diagnostisches Tool genutzt werden. Die gesammelten Erfahrungen mit der Anwendung der Kultur innerhalb dieser Arbeit werfen noch einige Fragen auf. Neue Ansatzpunkte zur Diskussion und Verbesserung der Ergebnisse wären eine Sporens Selektion (Alkohol, Hitze), die Nutzung einer Agarplatte pro Probe, eine Auswertung der Kulturen nach 48h und 96h sowie die vermehrte Anwendung der mikroskopischen Untersuchung bei fragwürdiger Koloniemorphologie. Die PCR ist ein sehr sensibles Nachweisverfahren, dessen optimale Auswertung einen gewissen Erfahrungsschatz in diesem Bereich fordert. Die Anamnese/Symptomatik der Patienten sollte bei der Auswertung unbedingt beachtet werden [Knetsch et al., 2011]. Auch beide ELISA-Verfahren zum Nachweis der *C. difficile* spezifischen GDH lieferten die erwarteten, guten Ergebnisse. Resultierend aus den Ergebnissen dieser Testphase stellte auch das mikrobiologische Labor der ZfD GmbH Chemnitz seinen Algorithmus zur *C. difficile* Diagnostik um. Fortan wird die Kombination aus GDH ELISA und anschließender Toxin-Detektion mittels RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B-Immunassay auf die Probe gestellt. Die Kultivierung der Stuhlproben erfolgt nun nach positiver Detektion des Erregers.

Bei Betrachtung der Altersstruktur der Patienten mit einer *C. difficile* Anforderung im mikrobiologischen Labor des ZfD Chemnitz liegt das Durchschnittsalter bei 69 Jahren. Ein Grund für das hohe Durchschnittsalter ist zum einen die Häufigkeit an Erkrankungen mit zunehmendem Alter und damit verbunden auch ein erhöhtes Risiko des Krankenhausaufenthalts. Eine mit dem Alter schwächere Immunabwehr sowie ein massiver Wasserverlust resultierend aus einer Dehydratation fördern die Anfälligkeit der älteren Bevölkerung [Bennett and Greenough, 1993; Ginaldi et al., 1999; Trinh and Prabhakar, 2007; Schols et al., 2009].

7.2 Evaluierung des Antigen ELISAs

Die Evaluierung des Immunassays der Firma R-Biopharm, RIDASCREEN® *Clostridium difficile* GDH, war der zweite große Untersuchungspunkt in dieser Arbeit. Innerhalb der Studie „Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* specific Glutamatdehydrogenase (GDH) in stool samples” in Zusammenarbeit mit R-Biopharm (Darmstadt) und dem ZfD Chemnitz wurde die Pilotcharge 1 erstmals einer externen Testreihe unterzogen. Im Vorfeld wurde die Intra- und Inter-Assay Reproduzierbarkeit der Charge getestet. Die Auswertung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit lieferte für die Referenzproben 1, 2 und 4 gute Werte von 10,87%, 7,65% und 17,26 (leicht erhöht), alle Ergebnisse lagen eng bei einander. Mit 23,07% liegt der Variationskoeffizient (VK) der Referenzprobe 3 nicht mehr im optimalen Bereich. Die Rohdaten verraten, dass je der erste der drei Messwerte pro Lauf, wie in Abbildung 18 zu sehen, etwas höher lag.

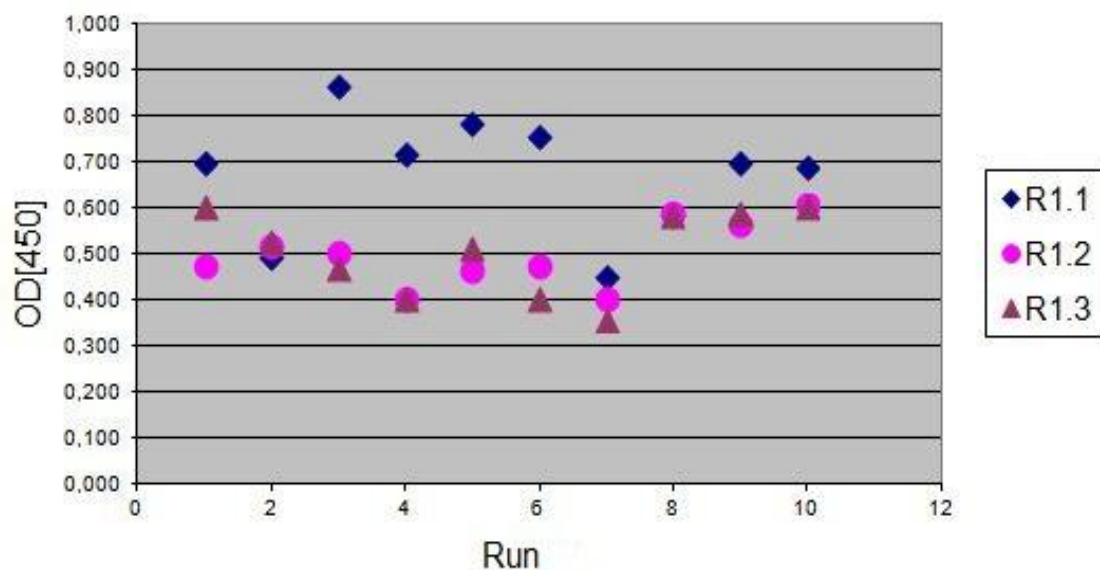


Abbildung 18: graphische Darstellung der Messwert-Verteilung von Referenzlösung 3

Bezeichnung: R1.1: erster Messwert Well 1/3, R1.2: zweiter Messwert Well 2/3, R1.3: dritter Messwert Well 3/3, Die Grafik gibt einen Überblick über die Ergebnisse aller Messungen der Referenzprobe 3 über 5 Tage.

Auch die Verteilung der Messwerte zu Referenz 5 ist mit einem VK von 20,79% nicht zufriedenstellend. Anders als bei Referenz 3 ist kein einheitliches Muster des Störfaktors anhand der Messwerte zu erkennen. Unabhängig davon, ist der Grund für auffällig abweichende Messwerte im Nachhinein nicht mehr nachvollziehbar. Der VK der Referenzprobe 6 liegt mit 108,58% erschreckend hoch, erklärbar ist dieser Wert mit dem Messergebnis aus dem 8. Lauf. Die Messung ergab einen OD von 0,017. Dieses Ergebnis liegt noch deutlich im negativen Bereich, jedoch bewirkt eine solche Abweichung im Bereich kleiner Konzentrationen eine massive Erhöhung des VK. Wie in Abbildung 19 sichtbar, liegen die Werte eng bei einander, nur ein Ergebnis tanzt aus der Reihe.

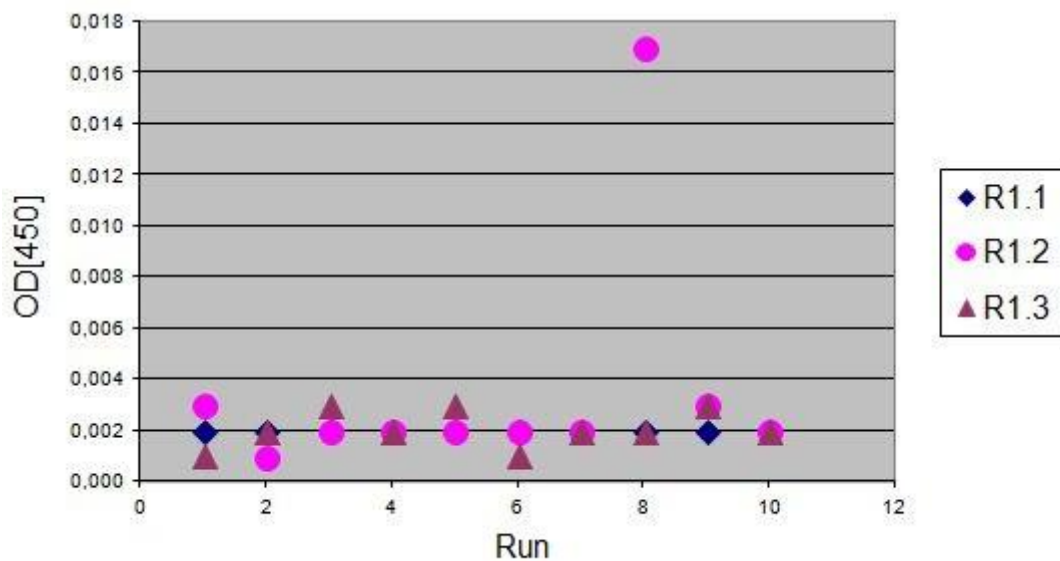


Abbildung 19: graphische Darstellung der Messwert-Verteilung von Referenzlösung 6

Bezeichnung: R1.1: erster Messwert Well 1/3, R1.2: zweiter Messwert Well 2/3, R1.3: dritter Messwert Well 3/3, Die Grafik gibt einen Überblick über die Ergebnisse aller Messungen der Referenzprobe 6 über 5 Tage.

Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde anhand der Ergebnisse aus denselben Läufen, 2 pro Tag über 5 aufeinanderfolgende Tage, berechnet. Daraus bildet sich eine ähnliche Aufstellung der Ergebnisse ab, die VKs für die Referenzproben 1 und 2 liefern mit 12,28% und 11,70% vertretbare Werte. Die Ergebnisse der Referenzlösungen 3, 4 und 5 liefern mit VK-Ergebnissen über 19% nicht die erwünschten Werte. Zu erklären ist dieses Muster auch wieder durch einzelne abweichende Ergebnisse. Mit über 108% im VK schneidet die Untersuchung der Referenz 6 am schlechtesten ab. Anhand der ermittelten Ergebnisse der inter- sowie intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde die Pilotcharge 1 ohne Veränderungen für die Untersuchungsreihe zur Verfügung gestellt. Neben der Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des RIDASCREEN® *Clostridium difficile* GDH-ELISA wurden die ermittelten Leistungsdaten auch mit einem kommerziellen Konkurrenz-Verfahren (Wampole® C.DIFF CHEK™-60) verglichen. Wie bereits aus der Erklärung im Teil 7.1 zu entnehmen, lieferte die angewendete Kultur-Methodik aufgrund verschiedener Einflussfaktoren enttäuschende Ergebnisse. Aus diesem Grund bezieht sich dieser Teil der Diskussion auf die Leistungsdaten des ELISAs in Bezug auf die 16S rDNA-PCR. In der Abbildung 20 sind die Intervalle der Leistungsdaten beider GDH-ELISA Verfahren graphisch dargestellt.

Sensitivität und PPV Durchschnittswerte der Assays liegen mit deutlichem Abstand voneinander entfernt, Spezifität und NPV-Werte liegen wiederum recht eng bei einander. Anhand dieser Werte zeichnen sich beide Methoden durch eine hohe Spezifität und einen guten NPV-Wert aus, wobei sich das Assay der Firma TECHLAB aufgrund der etwas besseren Ergebnisse etwas nach vorn schiebt.

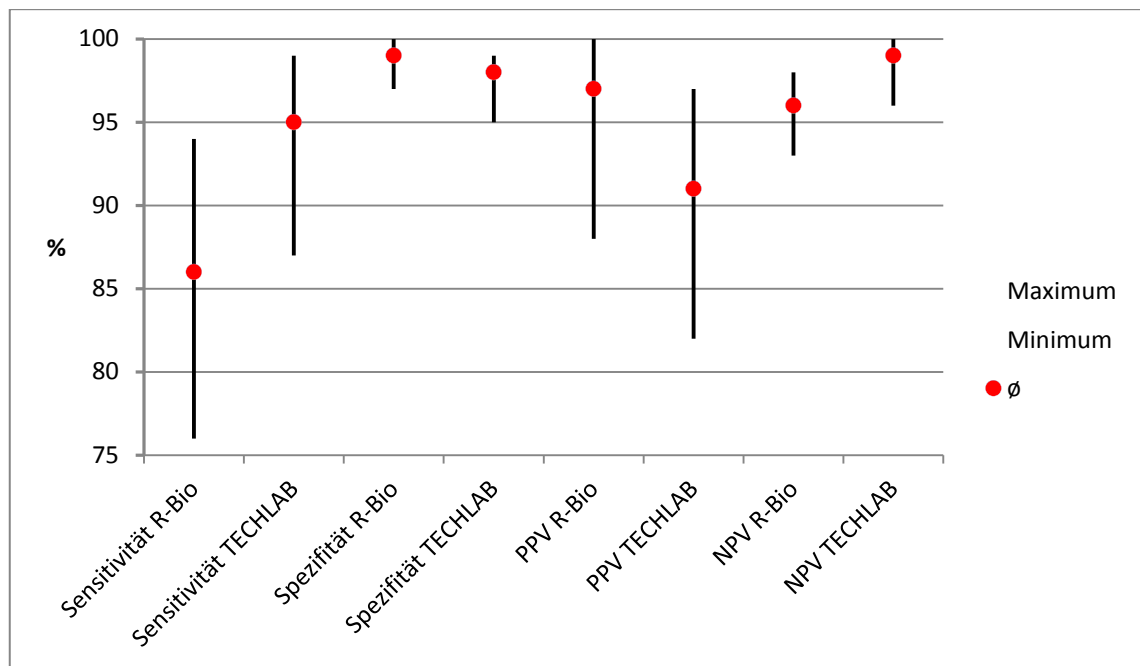


Abbildung 20: graphische Darstellung der prozentualen Leistungsdaten beider GDH-ELISA Verfahren

Im Anschluss auf die eigentliche Studie erfolgte eine weitere Untersuchung der modifizierten Pilotchargen 2 und 3. Unter Verwendung gleicher Proben sowie identischer Abarbeitung der ELISA-Verfahren. Eine Verbesserung der Ergebnisse war zu beobachten. Die Sensitivität der Pilotcharge 2 (PC2) erreichte mit 91% den höchsten Wert. Auch der negative Vorhersagewert (NPV) verbesserte sich von 96% (PC1) auf 98% (PC2). Ohne Veränderungen lieferte die Spezifität ein stabiles Ergebnis von 99% (Intervall: 97%-100%). Auch der PPV-Wert blieb gleichmäßig, lediglich der Intervall verkleinerte sich um 1% bei den Pilotchargen 2 und 3. Ein abschließendes Fazit zu den drei Chargen ist eindeutig. Charge 2 und 3 zeigen Verbesserungen beziehungsweise gleichbleibende Ergebnisse, die Modifikation war erfolgreich. Die besten Leistungsdaten lieferte die Pilotcharge 2.

8 Ausblick

Die intensiven Rechercharbeiten zur Erstellung dieser Arbeit lassen die Aussage zu, dass die Methodik der Toxin-Detektion mit Hilfe verschiedener ELISA-Verfahren derzeit weltweit noch die meist genutzte Nachweismethode in der *C. difficile* Diagnostik darstellt. Neben der Entwicklung neuer Testsysteme ist auch die Entwicklung neuer Algorithmen schon viele Jahre präsent. Aufgrund zeitlichen einer sehr guten Spezifität rücken die ELISA- Verfahren zum Nachweis *C. difficile* spezifischer GDH zunehmend in den Vordergrund. Ein weiterer Vorteil ist natürlich auch der geringere zeitliche Aufwand sowie eine erleichterte Abarbeitung dank automatisierter Systeme der ELISA-Verfahren im Vergleich zu üblichen Kultivierungsmethoden. Trotzdem ist die Kultur ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik, Kolonien positiver Kulturen werden archiviert beziehungsweise zur Typisierung der Stämme verwendet. Begründet durch den hohen Aufwand wird der zytotoxizitäts-Test in Routine-Laboratorien in den seltensten Fällen verwendet, in Forschungs- und Entwicklungseinrichtungen ist das Verfahren (Goldstandard) eher von Interesse. Wann der Durchbruch der PCR-Verfahren innerhalb der *C. difficile* Diagnostik zu Stande kommt ist fraglich. Die Entwicklung der molekularbiologischen Verfahren für die Routinediagnostik ist in vollem Gange. Jedoch setzt diese Technik eine enge Zusammenarbeit mit den behandelnden Ärzten sowie einen beachtlichen Kapitaleinsatz zur Anschaffung der sensiblen Gerätschaften voraus. Aufgrund der hohen Sensitivität sowie einem minimalen Zeitaufwand werden diese Verfahren in der Zukunft sicher unumgänglich sein. Die Detektion der Toxingene mit Hilfe der PCR wird die Technik der Toxin-ELISAs hoffentlich schon bald ablösen. Ebenso wäre eine gewisse Standardisierung, eventuell die Auswahl zwischen vorgeschriebenen Algorithmen ein weiterer Schritt in die richtige Richtung. Dieser Schritt würde die weltweite Datenanalyse vereinfachen und Missstände in der Diagnostik weitestgehend verhindern.

Literaturverzeichnis

- Ackermann, Grit. 2004. „Clostridium difficile - Aktueller Stand Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe“. *MIKROBIOLOGE* (14): 123–129.
- Åkerlund, Thomas; Persson, Ingela; Unemo, Magnus; Norén, Torbjörn; Svenungsson, Bo; Wullt, Marlene; Burman, Lars G. 2008. „Increased Sporulation Rate of Epidemic Clostridium difficile Type 027/NAP1“. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (4): 1530–1533.
- Baldassarri, L.; Donelli, G.; Cerquetti, M.; Mastrantonio, P. 1991. „Capsule-like structures in Clostridium difficile strains.“ *Microbiologica* 14 (4): 295–300.
- Barbut, F.; Delmée, M.; Brazier, J. S.; Petit, J. C.; Poxton, I. R.; Rupnik, M.; Lalande, V. et al. 2003. „A European Survey of Diagnostic Methods and Testing Protocols for Clostridium Difficile“. *Clinical Microbiology and Infection* 9 (10): 989–996.
- Barbut, F. and Petit, J.-C. 2001. „Epidemiology of Clostridium Difficile-associated Infections“. *Clinical Microbiology and Infection* 7 (8): 405–410.
- Barbut, F.; Richard, A.; Hamadi, K.; Chomette, V.; Burghoffer, B.; Petit, J.-C. 2000. „Epidemiology of Recurrences or Reinfections of Clostridium difficile-Associated Diarrhea“. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (6): 2386–2388.
- Barketi-Klai, A.; Hoys, S.; Lambert-Bordes, S.; Collignon, A.; Kansau, I. 2011. „Role of fibronectin-binding protein A in Clostridium difficile intestinal colonization“. *Journal of medical microbiology* 60 (8): 1155–1161.
- Bartlett, J. G. 1994. „Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism“. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 18 (4): 265–272.
- Bartlett, J. G.; Chang, T. W.; Gurwith, M.; Gorbach, S. L.; Onderdonk, A. B. 1978. „Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia“. *The New England journal of medicine* 298 (10): 531–534.
- Bartlett, J. G.; Tedesco, F. J.; Shull, S.; Lowe, B.; Chang, T. 1980. „Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis“. *Gastroenterology* 78 (3): 431–434.
- Bartlett, J. G. 2006. „Narrative Review: The New Epidemic of Clostridium difficile-Associated Enteric Disease“. *Annals of Internal Medicine* 145 (10): 758–764.
- Bartlett, J. G. and Gerding, D. N. 2008. „Clinical Recognition and Diagnosis of Clostridium difficile Infection“. *Clinical Infectious Diseases* 46 (s1): 12–18.
- Bennett, R. G. and Greenough 3rd, W. D. 1993. „Approach to acute diarrhea in the elderly“. *Gastroenterology clinics of North America* 22 (3): 517–533.
- Bergamin, B.; Hess, Th.; Jost, R.; Ballmer, P. E.; Imoberdorf, R. 2000. „Rezidivierende Clostridium-difficile-Enterokolitis“. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* (130): 1681–1684.
- Blawat, K. 2010. „Mangelnde Hygiene in Krankenhäusern: Tödliche Hände“. <http://www.sueddeutsche.de/wissen/mangelnde-hygiene-in-krankenhaeusern-toedliche-haende-1.972974>.

- Boom, R.; Sol, C.; Wertheim-van Dillen, P. 1990. „Rapid purification of ribosomal RNAs from neutral agarose gels.“ *Nucleic Acids Research* 18 (8): 2195.
- Borriello, S. P. 1998. „Pathogenesis of Clostridium difficile infection“. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 (3): 13–19.
- Brown, N. A.; Lebar, W. D.; Young, C. L.; Hankerd, R. E.; Newton, D. W. 2011. „Diagnosis of Clostridium difficile infection: comparison of four methods on specimens collected in Cary-Blair transport medium and tcdB PCR on fresh versus frozen samples“. *Infectious Disease Reports* 3 (1).
<http://www.pagepress.org/journals/index.php/idr/article/view/idr.2011.e5/2937>.
- Calabi, E.; Calabi, F.; Phillips, A. D.; Fairweather, N. F. 2002. „Binding of Clostridium difficile Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues“. *Infection and Immunity* 70 (10): 5770–5778.
- Cecil, J. A. 2012. „Clostridium difficile: Changing Epidemiology, Treatment and Infection Prevention Measures“. *Current infectious disease reports* 14 (6): 612–619.
- Choi, H. K.; Kim, K. H.; Lee, S. H.; Lee, S. J. 2011. „Risk Factors for Recurrence of Clostridium difficile Infection: Effect of Vancomycin-resistant Enterococci Colonization“. *Journal of Korean Medical Science* 26 (7): 859–864.
- Cohen, S. H.; Gerding, D. N.; Johnson, S.; Kelly, C. P.; Loo, V. G.; McDonald, L. C.; Pepin, J.; Wilcox, M. H. 2010. „Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)“. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 31 (5): 431–455.
- Cummings, B. 2006. „Biology Pictures: Endospore Formation“. <http://www.biology-pictures.blogspot.de/2011/11/endospore-formation.html>.
- Dallal, R. M.; Harbrecht, B. G.; Boujoukas, A. J.; Sirio, C. A.; Farkas, L. M.; Lee, K. K.; Simmons, R. L. 2002. „Fulminant Clostridium difficile: An Underappreciated and Increasing Cause of Death and Complications“. *Annals of Surgery* 235 (3): 363–372.
- Darai, G.; Handermann, M.; Sonntag, H.-G.; Zöller, L. 2011. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Springer DE.
- Davies, H. A. and Borriello, S. P. 1990. „Detection of capsule in strains of Clostridium difficile of varying virulence and toxigenicity“. *Microbial pathogenesis* 9 (2): 141–146.
- Dawson, L. F.; Valiente, E.; Wren, B. W. 2009. „Clostridium difficile--a continually evolving and problematic pathogen“. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9 (6): 1410–1417.
- Dawson, L. F.; Donahue, E. H.; Cartman, S. T.; Barton, R. H.; Bundy, J.; McNerney, R.; Minton, N. P.; Wren, B. W. 2011. „The Analysis of Para-cresol Production and Tolerance in Clostridium Difficile 027 and 012 Strains“. *BMC Microbiology* 11 (1): 86.
- Delmée, M.; Broeck, J. V.; Simon, A.; Janssens, M.; Avesani, V. 2005. „Laboratory Diagnosis of Clostridium Difficile-associated Diarrhoea: a Plea for Culture“. *Journal of Medical Microbiology* 54 (2): 187–191.

- Dupuy, B. and Matamouros, S. 2006. „Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase σ -factors“. *Research in microbiology* (157): 201–205.
- Eastwood, K.; Else, P.; Charlett, A.; Wilcox, M. 2009. „Comparison of Nine Commercially Available *Clostridium Difficile* Toxin Detection Assays, a Real-Time PCR Assay for *C. Difficile* *tcdB*, and a Glutamate Dehydrogenase Detection Assay to Cytotoxin Testing and Cytotoxigenic Culture Methods“. *Journal of Clinical Microbiology* 47 (10): 3211–3217.
- Eckmanns, T.; Rath, A.; Bräuer, H.; Daschner, F.; Rüden, H.; Gastmeier, P. 2001. „Compliance der Händedesinfektion auf Intensivstationen“. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 126 (25/26): 745–749.
- Von Eichel-Streiber, Ch.; Laufenberg-Feldmann, R.; Saringen, S.; Schulze, J.; Sauerborn, M. 1991. „Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B“. *Molecular Genetics and Genomics* (233): 260–268.
- Von Eichel-Streiber, C.; Moos, M.; Gisch, K.; Braun, V. 2011. „Method for Detecting and Identifying a Variant *C. Difficile* Strain in a Sample“. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2011012098>.
- Elliot, B.; Squire, M. M.; Thean, S.; Chang, B. J.; Brazier, J. S.; Rupnik, M.; Riley, T. V. 2011. „New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among clinical isolates of *Clostridium difficile* in Australia“. *Journal of medical microbiology* 60 (8): 1108–1111.
- ESCMID. 2012. „ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*-ESGCD“. <http://www.escmid.org/research-projects/study-groups/clostridium-difficile/#>.
- Fawley, W. N.; Underwood, S.; Freeman, J.; Baines, S. D.; Saxton, K.; Stephenson, K.; Owens Jr, R. C.; Wilcox, M. H. 2007. „Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains“. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 28 (8): 920–925.
- Fekety, R.; Kim, K. H.; Brown, D.; Batts, H. D.; Cudmore, M.; Silva Jr, J. 1981. „Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment“. *The American journal of medicine* 70 (4): 906–908.
- Fekety, R. and Shah, A. B. 1993. „Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis“. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 269 (1): 71–75.
- Freeman, J. and Wilcox, M. H. 2003. „The effects of storage conditions on viability of *Clostridium difficile* vegetative cells and spores and toxin activity in human faeces“. *Journal of Clinical Pathology* 56 (2): 126–128.
- Fuchs, G. and Schlegel, H. G. 2006. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
- George, W. L.; Sutter, V. L.; Citron, D.; Finegold, S. M. 1979. „Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*“. *Journal of Clinical Microbiology* 9 (2): 214–219.
- Geric, B.; Carman, R. J.; Rupnik, M.; Genheimer, C. W.; Sambol, S. P.; Lyerly, D. M.; Gerding, D. N.; Johnson, S. 2006. „Binary Toxin-Producing, Large *Clostridium* Toxin-Negative *Clostridium Difficile* Strains Are Enterotoxigenic but Do Not Cause Disease in Hamsters“. *Journal of Infectious Diseases* 193 (8): 1143–1150.
- Geric, B.; Rupnik, M.; Gerding, D. N.; Grabnar, M.; Johnson, S. 2004. „Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes

- among clinical isolates in an American hospital“. *Journal of medical microbiology* 53 (9): 887–894.
- Ginaldi, L.; De Martinis, M.; D’Ostilio, A.; Marini, L.; Loreto, M. F.; Martorelli, V.; Quaglino, D. 1999. „The immune system in the elderly: II. Specific cellular immunity“. *Immunologic research* 20 (2): 109–115.
- Goorhuis, A.; Bakker, D.; Corver, J.; Debast, S. B.; Harmanus, C.; Notermans, D. W.; Bergwerff, A. A.; Dekker, F. W.; Kuijper, E. J. 2008. „Emergence of *Clostridium Difficile* Infection Due to a New Hypervirulent Strain, Polymerase Chain Reaction Ribotype 078“. *Clinical Infectious Diseases* 47 (9): 1162–1170.
- Green, R. H. 1974. „The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters“. *The Yale journal of biology and medicine* 47 (3): 166–181.
- Gülke, I.; Pfeifer, G.; Liese, J.; Fritz, M.; Hofmann, F.; Aktories, K.; Barth, H. 2001. „Characterization of the Enzymatic Component of the ADP-Ribosyltransferase Toxin CDTa from *Clostridium Difficile*“. *Infection and Immunity* 69 (10): 6004–6011.
- Günther, A. 2010. „Inzidenz von *Clostridium difficile* an einem Universitätsklinikum und Untersuchungen zum Nachweis von *C. difficile* in der Krankenhausumgebung“. Bad Driburg: Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster.
- Hafiz, S. 1974. „*Clostridium difficile* and its Toxins“. Leeds: University of Leeds.
- Haglund, C. M. Welch, M. D. 2011. „Pathogens and Polymers: Microbe–host Interactions Illuminate the Cytoskeleton“. *The Journal of Cell Biology* 195 (1): 7–17.
- Hall, I.C. and O’Toole, E. 1935. „Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*“. *American Journal of Diseases of Children* 49 (2): 390–402
- Harvey, R. B.; Norman, K. N.; Andrews, K.; Norby, B.; Hume, M. E.; Scanlan, C. M.; Hardin, M. D.; Scott, H. M. 2011. „*Clostridium difficile* in retail meat and processing plants in Texas“. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 23 (4): 807–811.
- Hatheway, C. L. 1990. „Toxigenic clostridia.“ *Clinical Microbiology Reviews* 3 (1): 66–98.
- Health Protection Agency, HPA. 2006. „*Clostridium difficile*: Findings and recommendations from a review of the epidemiology and a survey of Directors of Infection Prevention and Control in England“. http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947403482.
- Hennequin, C.; Collignon, A.; Karjalainen, T. 2001. „Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress“. *Microbial pathogenesis* 31 (5): 255–260.
- Hennequin, C.; Janoir, C.; Barc, M.-C.; Collignon, A.; Karjalainen, T. 2003. „Identification and Characterization of a Fibronectin-binding Protein from *Clostridium Difficile*“. *Microbiology* 149 (10): 2779–2787.
- Hurley, B. W. and Nguyen, C. 2002. „The Spectrum of Pseudomembranous Enterocolitis and Antibiotic-Associated Diarrhea“. *Archives of Internal Medicine* 162 (19): 2177–2184.
- Indra, A.; Huhulescu, S.; Fiedler, A.; Kernbichler, S.; Blaschitz, M.; Allerberger, F. 2009. „Outbreak of *Clostridium difficile* 027 infection in Vienna, Austria 2008–

- 2009“. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14 (17).
- Jabbar, U.; Leischner, J.; Kasper, D.; Gerber, R.; Sambol, S. P.; Parada, J. P.; Johnson, S.; Gerding D. N. 2010. „Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of *Clostridium difficile* spores from hands“. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 31 (6): 565–570.
- Johnson, E. A. 1999. „Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature’s most toxic proteins“. *Annual review of microbiology* 53: 551–575.
- Johnson, S. 2009. „Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes“. *The Journal of infection* 58 (6): 403–410.
- Jones, R. L. 1989. „Diagnostic Procedures for Isolation and Characterization of *Clostridium Difficile* Associated with Enterocolitis in Foals“. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1 (1): 84–86.
- Just, I. and Gerhard, R. 2004. „Large clostridial cytotoxins“. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 152: 23–47..
- Just, I.; Selzer, J.; Wilm, M.; von Eichel-Streiber, C.; Mann, M.; Aktories, K. 1995. „Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B“. *Nature* 375 (6531): 500–503.
- Kaier, K.; Hagist, C.; Frank, U.; Conrad, A.; Meyer, E. 2009. „Two time-series analyses of the impact of antibiotic consumption and alcohol-based hand disinfection on the incidences of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and *Clostridium difficile* infection“. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 30 (4): 346–353.
- Karjalainen, T.; Saumier, N.; Barc, M.-C.; Delmée, M.; Collignon, A. 2002. „*Clostridium Difficile* Genotyping Based on *slpA* Variable Region in S-Layer Gene Sequence: An Alternative to Serotyping“. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2452–2458.
- Kato, H.; Yokoyama, T.; Arakawa, Y. 2005. „Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan“. *Journal of medical microbiology* 54 (2): 167–171.
- Kawada, M.; Annaka, M.; Kato, H.; Shibasaki, S.; Hikosaka, K.; Mizuno, H.; Masuda, Y.; Inamatsu, T. 2011. „Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection“. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 17 (6): 807–811.
- Kelly, C. P. and LaMont, J. T. 1998. „*Clostridium difficile* infection“. *Annual review of medicine* 49: 375–390.
- Kelly, C. P.; Pothoulakis, C.; LaMont, J. T. 1994. „*Clostridium difficile* colitis“. *The New England journal of medicine* 330 (4): 257–262.
- Kim, J. W.; Lee, K. L.; Jeong, J. B.; Kim, B. G.; Shin, S.; Kim, J. S.; Jung, H. C.; Song, I. S. 2010. „Proton pump inhibitors as a risk factor for recurrence of *Clostridium-difficile*-associated diarrhea“. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 16 (28): 3573–3577.
- Kim, K. H.; Fekety, R.; Batts, D. H.; Brown, D.; Cudmore, M.; Silva Jr, J.; Waters, D. 1981. „Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of

- patients with antibiotic-associated colitis“. *The Journal of infectious diseases* 143 (1): 42–50.
- Kist, M.; Bockemühl, J.; Aleksic, S.; Altwegg, M.; Autenrieth, I. B.; Bär, W.; Beutin, L.; et al. 2000. „Infektionen des Darmes“ 9: 1–62.
- Knetsch, C. W.; Bakker, D.; de Boer, R. F.; Sanders, I.; Hofs, S.; Kooistra-Smid, A. M. D.; Corver, M.; Eastwood, K.; Wilcox, M. H.; Kuijper, E. J. 2011. „Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection“. *Journal of clinical microbiology* 49 (1): 227–231.
- Köppen, H. 2010. *Köppen, Gastroenterologie*. Georg Thieme Verlag.
- Kuehne, S. A.; Cartman, S. T.; Heap, J. T.; Kelly, M. L.; Cockayne, A.; Minton, N. P. 2010. „The Role of Toxin A and Toxin B in *Clostridium Difficile* Infection“. *Nature* 467 (7316): 711–713.
- Kuijper, E. J.; Barbut, F.; Brazier, J. S.; Kleinkauf, N.; Eckmanns, T.; Lambert, M. L.; Drudy, D.; et al. 2008. „Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008“. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13 (31).
- Kuijper, E. J.; Coignard, B.; Tüll, P.; the ESCMID Study Group for *Clostridium difficile* (esgcd), EU Member States, the European Centre for Disease Prevention, und Control (ecdc). 2006. „Emergence of *Clostridium Difficile*-associated Disease in North America and Europe“. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 2–18.
- Larson, H. E.; Barclay, F. H.; Honour, P.; Hill, I. D. 1982. „Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants“. *The Journal of infectious diseases* 146 (6): 727–733.
- Leifeld, L. and Kruis, W. 2012. „[Current management of toxic megacolon]“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 50 (3): 316–322.
- Lessa, F. C.; Gould, C. V.; McDonald, L. C. 2012. „Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology“. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 (2): 65–70.
- Loo, V. G.; Poirier, L.; Miller, M. A.; Oughton, M.; Libman, M. D.; Michaud, S.; Bourgault, A.-M.; et al. 2005. „A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality“. *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2442–2449.
- Lyrras, D.; O’Connor, J. R.; Howarth, P. M.; Sambol, S. P.; Carter, G. P.; Phumoonna, T.; Poon, R.; et al. 2009. „Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*“. *Nature* 458 (7242): 1176–1179.
- MacCannell, D. R.; Louie, T. J.; Gregson, D. B.; Laverdiere, M.; Labbe, A.-C.; Laing, F.; Henwick, S. 2006. „Molecular Analysis of *Clostridium Difficile* PCR Ribotype 027 Isolates from Eastern and Western Canada“. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (6): 2147–2152.
- Marsh, J. W.; Arora, R.; Schlackman, J. L.; Shutt, K. A.; Curry, S. R.; Harrison, L. H. 2012. „Association of Relapse of *Clostridium difficile* Disease with BI/NAP1/027“. *Journal of clinical microbiology* 50 (12): 4078–4082.
- Mauri, P. L.; Pietta, P. G.; Maggioni, A.; Cerquetti, M.; Sebastianelli, A.; Mastrantonio, P. 1999. „Characterization of surface layer proteins from *Clostridium difficile* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry“. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* 13 (8): 695–703.

- McDonald, L. C.; Killgore, G. E.; Thompson, A.; Owens, R. C.; Kazakova, S. V.; Sambol, S. P.; Johnson, S.; Gerding, D. N. 2005. „An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*“. *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2433–2441.
- McFarland, L. V.; Mulligan, M. E.; Kwok, R. Y.; Stamm, W. E. 1989. „Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection“. *The New England journal of medicine* 320 (4): 204–210.
- Munk, K. 2008. *Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Mylonakis, E.; Ryan, E. T.; Calderwood, S. B. 2001. „*Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review“. *Archives of internal medicine* 161 (4): 525–533.
- Nerandzic, M. M.; Pultz, M. J.; Donskey, C. J. 2009. „Examination of potential mechanisms to explain the association between proton pump inhibitors and *Clostridium difficile* infection“. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (10): 4133–4137.
- Nikolow, R. 2007. „Pflege in Kliniken immer schlechter“. *Der Tagesspiegel Online*, Juli 18. <http://www.tagesspiegel.de/politik/deutschland/betreuung-pflege-in-kliniken-immer-schlechter/990072.html>.
- Nusrat, A.; von Eichel-Streiber, C.; Turner, J. R.; Verkade, P.; Madara, J. L.; Parkos, C. A. 2001. „*Clostridium Difficile* Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins“. *Infection and Immunity* 69 (3): 1329–1336.
- O’Connor, J. R.; Johnson, S.; Gerding, D. N. 2009. „*Clostridium difficile* Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain“. *Gastroenterology* 136 (6): 1913–1924.
- Owens, R. C.; Donskey, C. J.; Gaynes, R. P.; Loo, V. G.; Muto, C. A. 2008. „Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection“. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 Suppl 1: S19–31.
- Péchiné, S.; Janoir, C.; Collignon, A. 2005. „Variability of *Clostridium Difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease“. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 5018–5025.
- Perelle, S.; Gibert, M.; Bourlioux, P.; Corthier, G.; Popoff, M. R. 1997. „Production of a Complete Binary Toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium Difficile* CD196.“ *Infection and Immunity* 65 (4): 1402–1407.
- Pituch, H.; Rupnik, M.; Obuch-Woszczatyński, P.; Grubescic, A.; Meisel-Mikołajczyk, F.; Łuczak, M. 2005. „Detection of Binary-toxin Genes (*cdtA* and *cdtB*) Among *Clostridium Difficile* Strains Isolated from Patients with *C. Difficile*-associated Diarrhoea (CDAD) in Poland“. *Journal of Medical Microbiology* 54 (2): 143–147.
- Poilane, I.; Karjalainen, T.; Barc, M. C.; Bourlioux, P.; Collignon, A. 1998. „Protease activity of *Clostridium difficile* strains“. *Canadian journal of microbiology* 44 (2): 157–161.
- Popoff, M. R.; Rubin, E. J.; Gill, D. M.; Boquet, P. 1988. „Actin-specific ADP-ribosyltransferase Produced by a *Clostridium Difficile* Strain.“ *Infection and Immunity* 56 (9): 2299–2306.

- Pothoulakis, C. 2000. „Effects of Clostridium difficile toxins on epithelial cell barrier“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915: 347–356.
- Promega. 2000. „Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit-Technical Bulletin“. <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/maxwell-16-tissue-lev-total-rna-purification-kit-protocol>.
- Pruitt, R. N.; Lacy, D. B. 2012. „Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B“. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2. http://www.frontiersin.org/Cellular_and_Infection_Microbiology/10.3389/fcimb.2012.00028/abstract.
- Razavi, B.; Apisarnthanarak, A.; Mundy, L. M. 2007. „Clostridium Difficile: Emergence of Hypervirulence and Fluoroquinolone Resistance“. *Infection* 35 (5): 300–307.
- R-Biopharm. 2011. „RIDA® GENE Clostridium difficile & Toxin A/B V“. http://www.r-biopharm.com/product_site.php?language=german&product_id=4760
- Reichardt, C.; Chaberny, I.; Kola, A.; Mattner, F.; Vonberg, R.; Gastmeier, P. 2007. „Dramatischer Anstieg von Clostridium-difficile -assoziierter Diarrhoe in Deutschland: Ist der neue Stamm PCR-Ribotyp 027 bereits angekommen?“ *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 132 (5): 223–228.
- Robert Koch Institut. 2007. „Empfehlungen zur Labordiagnostik bei Clostridium difficile-assozierten Durchfallerkrankungen“. http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/C/Clostridium_difficile/Empfehlungen_Labordiagnostik.html.
- Robert Koch Institut. 2011. „Clostridium difficile“. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html.
- Rousseau, C.; Poilane, I.; Diakite, F.; Feghoul, L.; Cruaud, P.; Collignon, A. 2010. „[Comparison of three Clostridium difficile culture media: interest of enhancing spore germination media?]“. *Pathologie-biologie* 58 (1): 58–61.
- Rousseau, C.; Poilane, I.; De Pontual, L.; Maherault, A.-C.; Le Monnier, A.; Collignon, A. 2012. „Clostridium difficile carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains“. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55 (9): 1209–1215.
- Rupnik, M. 2010. „Clostridium difficile toxinotyping“. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 646: 67–76.
- Rupnik, M.; Kato, N.; Grabnar, M.; Kato, H. 2003. „New Types of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strains Among Clostridium Difficile Isolates from Asia“. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (3): 1118–1125.
- Saif, N. Al and Brazier, J. S. 1996. „The Distribution of Clostridium Difficile in the Environment of South Wales“. *Journal of Medical Microbiology* 45 (2): 133–137.
- Sarker, M. R. and Paredes-Sabja, D. 2012. „Molecular basis of early stages of Clostridium difficile infection: germination and colonization“. *Future microbiology* 7: 933–943.

- Savidge, T. C.; Pan, W.-H.; Newman, P.; O'Brien, M.; Anton, P. M.; Pothoulakis, C. 2003. „Clostridium difficile toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine“. *Gastroenterology* 125 (2): 413–420.
- Schifferli, J.; Schoenenberger, R. A.; Haefeli, W. E. 2008. *Internistische Notfälle: Sicher durch die Akutsituation und die nachfolgenden 48 Stunden*. Georg Thieme Verlag.
- Schirmer, J. and Aktories, K. 2004. „Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins“. *Biochimica et biophysica acta* 1673 (1-2): 66–74.
- Schols, J. M. G. A.; Groot, C. P. G. M.; van der Cammen, T. J. M.; Olde Rikkert, M. M. G. 2009. „Preventing and treating dehydration in the elderly during periods of illness and warm weather“. *The journal of nutrition, health & aging* 13 (2): 150–157.
- Schunter, M. O.; Walles, T.; Fritz, P.; Meyding-Lamadé, U.; Thon, K.-P.; Fellermann, K.; Stange, E. F.; Lamadé, W. 2007. „Herpes simplex virus colitis complicating ulcerative colitis: A case report and brief review on superinfections“. *Journal of Crohn's and Colitis* 1 (1): 41–46.
- Schwan, C.; Nölke, T.; Kruppke, A. S.; Schubert, D. M.; Lang, A. E.; Aktories, K. 2011. „Cholesterol- and Sphingolipid-rich Microdomains Are Essential for Microtubule-based Membrane Protrusions Induced by Clostridium Difficile Transferase (CDT)“. *Journal of Biological Chemistry* 286 (33): 29356–29365.
- Schwan, C.; Stecher, B.; Tzivelekidis, T.; van Ham, M.; Rohde, M.; Hardt, W.-D.; Wehland, J.; Aktories, K. 2009. „Clostridium difficile Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria“. *PLoS Pathog* 5 (10): e1000626.
- Schwegmann, K. 2008. „Merkblatt-Clostridium difficile“. Nds. Landesgesundheitsamt, Krankenhaushygiene.
http://www.nlga.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=6624&article_id=19348&psmand=20.
- Silva Júnior, M. 2012. „Recent changes in Clostridium difficile infection“. *Einstein (São Paulo)* 10 (1): 105–109.
- Sloan, L. M.; Duresko, B. J.; Gustafson, D. R.; Rosenblatt, J. E. 2008. „Comparison of Real-Time PCR for Detection of the tcdC Gene with Four Toxin Immunoassays and Culture in Diagnosis of Clostridium Difficile Infection“. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (6): 1996–2001.
- Sorg, J. A. and Sonenshein, A. L. 2008. „Bile salts and glycine as cogerminants for Clostridium difficile spores“. *Journal of bacteriology* 190 (7): 2505–2512.
- Stubbs, S.; Rupnik, M.; Gibert, M.; Brazier, J.; Duerden, B.; Popoff, M. 2000. „Production of Actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary Toxin) by Strains of Clostridium Difficile“. *FEMS Microbiology Letters* 186 (2): 307–312.
- Surawicz, C. M. and McFarland, L. V. 1999. „Pseudomembranous Colitis: Causes and Cures“. *Digestion* 60 (2): 91–100.
- Tabaqchali, S. and Jumaa, P. 1995. „Diagnosis and management of Clostridium difficile infection“. *BMJ: British Medical Journal* 310 (6991): 1375–1380.
- Tang-Feldman, Y.; Mayo, S.; Silva, J.; Cohen, S. H. 2003. „Molecular Analysis of Clostridium difficile Strains Isolated from 18 Cases of Recurrent Clostridium difficile-Associated Diarrhea“. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (7): 3413–3414.

- Tasteyre, A.; Karjalainen, T.; Avesani, V.; Delmée, M.; Collignon, A.; Bourlioux, P.; Barc, M. C. 2001. „Molecular characterization of fliD gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups“. *Journal of clinical microbiology* 39 (3): 1178–1183.
- Tasteyre, A.; Barc, M.-C.; Collignon, A.; Boureau, H.; Karjalainen, T. 2001. „Role of FliC and FliD Flagellar Proteins of *Clostridium difficile* in Adherence and Gut Colonization“. *Infection and Immunity* 69 (12): 7937–7940.
- Taylor, N. S.; Thorne, G. M.; Bartlett, J. G. 1981. „Comparison of Two Toxins Produced by *Clostridium Difficile*“. *Infection and Immunity* 34 (3): 1036–1043.
- Tedesco, F. J.; Stanley, R. J.; Alpers, D. H. 1974. „Diagnostic features of clindamycin-associated pseudomembranous colitis“. *The New England journal of medicine* 290 (15): 841–843.
- Tenover, F. C.; Baron, E. J.; Peterson, L. R.; Persing, D. H. 2011. „Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection“. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 13 (6): 573–582.
- Thiel, H. and Roewer, N. 2009. *Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. Georg Thieme Verlag.
- Trinh, C. and Prabhakar, K. 2007. „Diarrheal diseases in the elderly“. *Clinics in geriatric medicine* 23 (4): 833–856, vii.
- Underwood, S.; Guan, S.; Vijayasubhash, V.; Baines, S. D.; Graham, L.; Lewis, R. J.; Wilcox, M. H.; Stephenson, K. 2009. „Characterization of the Sporulation Initiation Pathway of *Clostridium Difficile* and Its Role in Toxin Production“. *Journal of Bacteriology* 191 (23): 7296–7305.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. 1979. „Preparative and analytical purification of DNA from agarose“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (2): 615–619.
- Voth, D. E. and Ballard, J. D. 2005. „*Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease“. *Clinical Microbiology Reviews* 18 (2): 247–263.
- Warny, M.; Pepin, J.; Fang, A.; Killgore, G.; Thompson, A.; Brazier, J.; Frost, E.; McDonald, L. C. 2005. „Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe“. *Lancet* 366 (9491): 1079–1084.
- Wheeldon, L. J.; Worthington, T.; Hilton, A. C.; Elliott, T. S. J.; Lambert, P, A. 2008. „Physical and chemical factors influencing the germination of *Clostridium difficile* spores“. *Journal of applied microbiology* 105 (6): 2223–2230.
- Wilcox, M. H. and Spencer, R. C. 1992. „*Clostridium difficile* infection: responses, relapses and re-infections“. *The Journal of hospital infection* 22 (2): 85–92.
- Wilkins, T. D. and Lyster, D. M. 2003. „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (2): 531–534.
- Wilson, K. H.; Kennedy, M. J.; Fekety, F. R. 1982. „Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*“. *Journal of Clinical Microbiology* 15 (3): 443–446.
- Wilson, K. H. 1983. „Efficiency of Various Bile Salt Preparations for Stimulation of *Clostridium Difficile* Spore Germination“. *Journal of Clinical Microbiology* 18 (4): 1017–1019.

- Wilson. 1993. „The Microecology of *Clostridium difficile*“. *Clinical Infectious Diseases* 16 (Supplement 4): S214–S218.
- Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Teng, J. L. L.; Tse, H.; Yuen, K.-Y. 2008. „Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories“. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 (10): 908–934.
- Wren, M. W. D.; Kinson, R.; Sivapalan, M.; Shemko, M.; Shetty, N. R. 2009. „Detection of *Clostridium difficile* infection: a suggested laboratory diagnostic algorithm“. *British journal of biomedical science* 66 (4): 175–179.
- Wren, M. W. D.; Sivapalan, M.; Kinson, R.; Shetty, N. R. 2009. „Laboratory diagnosis of *clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory“. *British journal of biomedical science* 66 (1): 1–5.
- Younus and Steigbigel. 2004. „Nodular *Clostridium difficile* Colitis“. *New England Journal of Medicine*.350 (10): e9
- Zheng, L.; Keller, S. F.; Lyerly, D. M.; Carman, R. J.; Genheimer, C. W.; Gleaves, C. A.; Kohlhepp, S. J.; Young, S.; Perez, S.; Ye, K. 2004. „Multicenter Evaluation of a New Screening Test That Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens“. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (8): 3837–3840.

Anhang

| | |
|--|----|
| Teil 1: Arbeitsprotokolle für die automatisierte Abarbeitung am DSX..... | 84 |
| a) Standardprotokoll für das RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B-ELISA am DSX | 84 |
| b) Schnellprotokoll für das RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH - ELISA am DSX | 85 |
| c) Schnellprotokoll für das Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISA am DSX | 86 |
| Teil 2: Ergebnisse dieser Arbeit..... | 87 |
| a) Ergebnisse der gesamt-positiven Proben | 87 |
| b) diskrepante Ergebnisse | 89 |
| c) Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie..... | 91 |
| d) Ergebnisse der Pilotchargen 1/2/3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA | 93 |

Teil 1: Arbeitsprotokolle für die automatisierte Abarbeitung am DSX

a) Standardprotokoll für das RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B-ELISA am DSX

| RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B | | |
|---|---|--|
| Arbeits- schritt Nr. | Arbeitsschritt | Erklärung |
| 1 | Well Füll Überprüfung | messen der ODs bei 490 nm, OD>0,02 |
| 2 | pipettieren von Proben/ Standards/Kontrollen | je 100 µl negativ Kontrolle (NC), 100 µl positiv Kontrolle (PC), 100 µl Probe |
| 3 | dispensieren von Konjugat 1 | je 100 µl Konjugat 1 |
| 4 | Well Füll Überprüfung | 5 sek. schüttel er MTP, messen der ODs bei 490 nm, OD>0,02 |
| 5 | Inkubation | 60 min bei RT |
| 6 | Waschvorgang | je 300 µl Waschpuffer (WP), 5 Zyklen |
| 7 | dispensieren von Konjugat 2 | je 100 µl Konjugat 2 |
| 8 | Inkubation | 30 min bei RT |
| 9 | Waschvorgang | je 300 µl Waschpuffer (WP), 5 Zyklen |
| 10 | dispensieren von Substrat | je 100 µl Substrat |
| 11 | Inkubation | 15 min bei RT |
| 12 | dispensieren von Stopp | je 50 µl Stopp |
| 13 | Reader | Messung bei 450 nm Testwellenlänge (TW)/620 nm Referenzwellenlänge (RW) |

b) Schnellprotokoll für das RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH -ELISA am DSX

| RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH | | |
|---------------------------------------|---|--|
| Arbeits- schritt Nr. | Arbeitsschritt | Erklärung |
| 1 | Well Füll Überprüfung | messen der ODs bei 490 nm, OD>0,02 |
| 2 | pipettieren von Proben/ Standards/Kontrollen | je 100 µl negativ Kontrolle (NC), 100 µl positiv Kontrolle (PC), 100 µl Probe |
| 3 | dispensieren von Konjugat 1 | je 100 µl Konjugat 1 |
| 4 | Inkubation | 30 min bei 37 °C, geschüttelt |
| 5 | Waschvorgang | je 300 µl Waschpuffer (WP), 5 Zyklen |
| 6 | dispensieren von Konjugat 2 | je 100 µl Konjugat 2 |
| 7 | Inkubation | 15 min bei 37 °C, geschüttelt |
| 8 | Waschvorgang | je 300 µl Waschpuffer (WP), 5 Zyklen |
| 9 | dispensieren von Substrat | je 100 µl Substrat |
| 10 | Inkubation | 15 min bei 37 °C, geschüttelt |
| 11 | dispensieren von Stopp | je 50 µl Stopp |
| 12 | Reader | Messung bei 450 nm Testwellenlänge (TW)/620 nm Referenzwellenlänge (RW) |

c) Schnellprotokoll für das Wampole® C.DIFF CHEK™-60-ELISA am DSX

| Wampole® C.DIFF CHEK™-60 | | |
|--------------------------|---|--|
| Arbeits- schritt Nr. | Arbeitsschritt | Erklärung |
| 1 | Well Füll Überprüfung | messen der ODs bei 450 nm, OD>0,02 |
| 2 | dispensieren von Konjugat | je 50 µl Konjugat |
| 3 | pipettieren von Proben/ Standards/Kontrollen | je 100 µl negativ Kontrolle (NC), 100 µl positiv Kontrolle (PC), 100 µl Probe |
| 4 | Inkubation | 20 min bei 37 °C, geschüttelt |
| 5 | Waschvorgang | je 350 µl Waschpuffer (WP), 7 Zyklen |
| 7 | dispensieren von Substrat | je 100 µl Substrat |
| 8 | Inkubation | 10 min bei RT |
| 9 | dispensieren von Stopp | je 50 µl Stopp |
| 10 | Inkubation | 2 min bei RT |
| 12 | Reader | Messung bei 450 nm Testwellenlänge (TW)/620 nm Referenzwellenlänge (RW) |

Teil 2: Ergebnisse dieser Arbeit

a) Ergebnisse der gesamt-positiven Proben

| Proben Nr. | In-house Routine (homogenisierte Probe) | | | | | | Studie (homogenisierte Probe) | | | | | | | | | | |
|------------|---|--|---|--|---|---|-------------------------------|--|---|--|---|--------------|---|---|---|--------------|---|
| | Ergebnis Kultur | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile Tox A/B (R-Biopharm) | | nur wenn erforderlich: Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile Tox A/B (R-Biopharm) aus Kultur | | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile GDH (R-Biopharm) 1. PILOTCHARGE | | Ergebnis Techlab C. diff Chek 60 (Alere) | | Ergebnis RIDAGENE Clostridium difficile & Tox A/B (R-Biopharm) | | | | Ergebnis Wdh. RIDAGENE Clostridium difficile & Tox A/B (R-Biopharm) | | | |
| | | OD | | OD | | OD | | OD | | Ct (16S rDNA) | | Ct (tcd A/B) | | Ct (16S rDNA) | | Ct (tcd A/B) | |
| 7 | 1 | 0,003 | 0 | 3,363 | 1 | 2,706 | 1 | 3,207 | 1 | 31,58 | 1 | 34,42 | 1 | | | | |
| 9 | 1 | 0,002 | 0 | 3,387 | 1 | 0,646 | 1 | 1,182 | 1 | 40,25 | 1 | 40,02 | 1 | | | | |
| 19 | 1 | 2,955 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,222 | 1 | 21,87 | 1 | 24,19 | 1 | | | | |
| 27 | 1 | 2,979 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,355 | 1 | 32,94 | 1 | 35,49 | 1 | | | | |
| 36 | 1 | 2,178 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,296 | 1 | 28,1 | 1 | 31,11 | 1 | | | | |
| 54 | 1 | 0,235 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,309 | 1 | 24,23 | 1 | 25,88 | 1 | | | | |
| 55 | 1 | 0,703 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,306 | 1 | Pipettierfehler | 0 | 32,16 | 1 | 29,4 | 1 | 32,66 | 1 |
| 56 | 1 | 0,002 | 0 | 3,245 | 1 | 1,019 | 1 | 2,254 | 1 | 29,42 | 1 | 32,4 | 1 | | | | |
| 63 | 1 | 1,299 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,392 | 1 | 24,08 | 1 | 25,98 | 1 | | | | |
| 67 | 1 | 0,051 | 0 | 2,956 | 1 | 3,6 | 1 | 3,285 | 1 | 25,11 | 1 | 28,6 | 1 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|-----------|--|-------|---|
| 72 | 1 | 0,152 | 1 | 0,004 | 0 | 3,6 | 1 | 3,389 | 1 | 30,96 | 1 | 33,74 | 1 | | | |
| 88 | 1 | 0,003 | 0 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,288 | 1 | 28,2 | 1 | 30,89 | 1 | | | |
| 102 | 1 | 1,565 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,318 | 1 | 27,53 | 1 | 31,02 | 1 | | | |
| 116 | 1 | 3,279 | 1 | | | 3,438 | 1 | 3,298 | 1 | 31,44 | 1 | 33,41 | 1 | | | |
| 117 | 1 | 3,295 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,395 | 1 | 24,25 | 1 | 27,23 | 1 | | | |
| 124 | 1 | 0,012 | 0 | 2,866 | 1 | 3,6 | 1 | 3,292 | 1 | 26,03 | 1 | 28,96 | 1 | | | |
| 126 | 1 | 0,002 | 0 | 1,501 | 1 | 0,094 | 1 | 0,568 | 1 | 42,34 | 1 | 40,37 | 1 | | | |
| 128 | 1 | 0,907 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,277 | 1 | 26,42 | 1 | 28,35 | 1 | | | |
| 137 | 1 | 0,253 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,366 | 1 | 35,41 | 1 | 38,96 | 1 | | | |
| 138 | 1 | 3,188 | 1 | | | 3,418 | 1 | 3,406 | 1 | 29,11 | 1 | 31,73 | 1 | | | |
| 146 | 1 | 1,041 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,298 | 1 | 26,81 | 1 | 30,66 | 1 | | | |
| 162 | 1 | 0,409 | 1 | | | 3,342 | 1 | 3,316 | 1 | 24,29 | 1 | 26,76 | 1 | | | |
| 168 | 1 | 0,004 | 0 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,338 | 1 | 31,67 | 1 | 34,63 | 1 | | | |
| 174 | 1 | 3,221 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,28 | 1 | 26,17 | 1 | 29,57 | 1 | | | |
| 176 | 1 | 3,307 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,288 | 1 | 22,82 | 1 | 25,36 | 1 | | | |
| 180 | 1 | 2,721 | 1 | | | 3,398 | 1 | 3,314 | 1 | 26,98 | 1 | 29,55 | 1 | | | |
| 186 | 1 | 3,376 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,395 | 1 | 27,25 | 1 | 28,82 | 1 | | | |
| 197 | 1 | 3,6 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,216 | 1 | 21,27 | 1 | 23,53 | 1 | | | |
| 202 | 1 | 0,233 | 1 | | | 3,421 | 1 | 3,318 | 1 | 30,77 | 1 | 33,23 | inhibited | | 37,31 | 1 |
| 213 | 1 | 0,537 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,213 | 1 | 26,59 | 1 | 29,18 | inhibited | | 31,3 | 1 |
| 226 | 1 | 3,296 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,276 | 1 | 25,99 | 1 | 28,84 | 1 | | | |
| 249 | 1 | 3,436 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,31 | 1 | 24,98 | 1 | 28,03 | inhibited | | 28,45 | 1 |
| 269 | 1 | 3,23 | 1 | | | 3,431 | 1 | 3,334 | 1 | 28,53 | 1 | 31,7 | 1 | | | |
| 273 | 1 | 0,003 | 0 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,328 | 1 | 27,9 | 1 | 31,78 | 1 | | | |
| 291 | 1 | 1,018 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,292 | 1 | 27,01 | 1 | 29,57 | 1 | | | |
| 293 | 1 | 0,002 | 0 | 3,6 | 1 | 0,672 | 1 | 3,227 | 1 | 33,14 | 1 | 34,34 | 1 | | | |
| 295 | 1 | 0,002 | 0 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,283 | 1 | 31,6 | 1 | 33,67 | 1 | | | |
| 296 | 1 | 0,257 | 1 | | | 2,554 | 1 | 3,344 | 1 | 30,62 | 1 | 32,78 | 1 | | | |

b) diskrepante Ergebnisse

| Proben Nr. | In-house Routine (homogenisierte Probe) | | | | | Studie (homogenisierte Probe) | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--|---|--|---|---|---|--|---|--|---|--------------|---|---|---|--------------|---|
| | Ergebnis Kultur | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile Tox A/B (R-Biopharm) | | nur wenn erforderlich: Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile Tox A/B (R-Biopharm) aus Kultur | | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile GDH (R-Biopharm) 1. PILOTCHARGE | | Ergebnis Techlab C. diff Chek 60 (Alere) | | Ergebnis RIDAGENE Clostridium difficile & Tox A/B (R-Biopharm) | | | | Ergebnis Wdh. RIDAGENE Clostridium difficile & Tox A/B (R-Biopharm) | | | |
| | | OD | | OD | | OD | | OD | | Ct (16S rDNA) | | Ct (tcd A/B) | | Ct (16S rDNA) | | Ct (tcd A/B) | |
| 1 | 0 | 0,002 | 0 | | | 3,394 | 1 | 3,338 | 1 | 32,66 | 1 | 35,19 | 1 | | | | |
| 6 | 0 | 0,002 | 0 | | | 0,002 | 0 | 0,003 | 0 | 38,1 | 1 | 44,13 | 1 | | | | |
| 25 | 1 | 0,004 | 0 | 0,003 | 0 | 0,009 | 0 | 0,005 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 32 | 0 | 0,004 | 0 | | | 3,388 | 1 | 3,343 | 1 | 38,25 | 1 | 39,98 | 1 | | | | |
| 41 | 1 | 0,002 | 0 | 0,003 | 0 | 0,007 | 0 | 3,344 | 1 | 31,66 | 1 | - | 0 | | | | |
| 43 | 0 | 0,881 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,346 | 1 | 25,06 | 1 | 27,44 | 1 | | | | |
| 44 | 1 | 0,002 | 0 | 0,004 | 0 | 0,002 | 0 | 0,031 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 52 | 0 | 0,002 | 0 | | | 0,002 | 0 | 0,027 | 0 | - | 0 | 41,01 | 1 | - | 0 | - | 0 |
| 53 | 1 | 0,004 | 0 | 0,002 | 0 | 0,002 | 0 | 0,004 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 61 | 0 | 0,003 | 0 | | | 0,025 | 0 | 0,427 | 1 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 62 | 1 | 0,002 | 0 | 0,004 | 0 | 0,002 | 0 | 0,004 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 65 | 0 | 0,001 | 0 | | | 0,001 | 0 | 0,291 | 1 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 70 | 0 | 0,051 | 0 | | | 3,6 | 1 | 3,337 | 1 | 32,34 | 1 | 35,77 | 1 | | | | |
| 76 | 0 | 0,002 | 0 | | | 3,6 | 1 | 3,334 | 1 | 33,88 | 1 | 36,9 | 1 | | | | |
| 82 | 1 | 0,004 | 0 | 0,002 | 0 | 0,002 | 0 | 0,003 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 87 | 1 | 0,002 | 0 | 0,002 | 0 | -0,359 | 0 | 0,003 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 91 | 0 | 0,001 | 0 | | | 0,004 | 0 | 0,177 | 1 | - | 0 | - | 0 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|-----------|-------|---|-------|-----------|
| 95 | 0 | 0,002 | 0 | | | 1,228 | 1 | 3,345 | 1 | - | 0 | 39,22 | 1 | - | 0 | - | 0 |
| 100 | 1 | 0 | 0 | 3,278 | 1 | 0,002 | 0 | 0,028 | 0 | - | 0 | 39,05 | 1 | 38,35 | 1 | - | 0 |
| 107 | 0 | 2,127 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 26,1 | 1 | 29,03 | 1 | | | | |
| 108 | 0 | 3,225 | 1 | | | 3,432 | 1 | 3,304 | 1 | 28,5 | 1 | 31,48 | 1 | | | | |
| 109 | 0 | 0,002 | 0 | | | 0,006 | 0 | 2,054 | 1 | 27,77 | 1 | 30,52 | 1 | | | | |
| 119 | 1 | 0,002 | 0 | 0,006 | 0 | 0,002 | 0 | 0,004 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 120 | 0 | 0,028 | 0 | | | 3,6 | 1 | 3,298 | 1 | 29,64 | 1 | 34,62 | 1 | | | | |
| 121 | 0 | 0,038 | 0 | | | 3,6 | 1 | 3,313 | 1 | 34,73 | 1 | 37,87 | 1 | | | | |
| 130 | 0 | 3,357 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,335 | 1 | 27,14 | 1 | 30,22 | 1 | | | | |
| 134 | 1 | 0,003 | 0 | 0,002 | 0 | 0,002 | 0 | 0,005 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 135 | 1 | 0,01 | 0 | 0,002 | 0 | 0,003 | 0 | 0,004 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 139 | 0 | 0,003 | 0 | | | 0,003 | 0 | 0,007 | 0 | 38,16 | 1 | 39,85 | 1 | | | | |
| 145 | 1 | 0,001 | 0 | 0,003 | 0 | 0,003 | 0 | 0,005 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 152 | 1 | 0,002 | 0 | 0,265 | 1 | 0,032 | 0 | 0,506 | 1 | 42,79 | 1 | - | 0 | | | | |
| 170 | 0 | 0,003 | 0 | | | 3,451 | 1 | 3,272 | 1 | 36,04 | 1 | - | 0 | | | | |
| 175 | 1 | 0,002 | 0 | 0,044 | 0 | 1,628 | 1 | 3,295 | 1 | 36,26 | 1 | 37,96 | 1 | | | | |
| 204 | 1 | 0,014 | 0 | 0,317 | 1 | 0,031 | 0 | 0,372 | 1 | 31,29 | 1 | 32,97 | inhibited | | | - | inhibited |
| 206 | 0 | 0,003 | 0 | | | 0,002 | 0 | 0,204 | 1 | - | 0 | - | inhibited | | | - | inhibited |
| 216 | 0 | 0,002 | 0 | | | 0,48 | 1 | 2,385 | 1 | 33,55 | 1 | 36,19 | 1 | | | | |
| 218 | 0 | 0,004 | 0 | | | 1,496 | 1 | 2,789 | 1 | 36,57 | 1 | 39,05 | 1 | | | | |
| 222 | 0 | 3,6 | 1 | | | 3,6 | 1 | 3,27 | 1 | 24 | 1 | 27,6 | 1 | | | | |
| 238 | 1 | 3,11 | 1 | | | 0,002 | 0 | 0,182 | 1 | 21,36 | 1 | 24,21 | 1 | | | | |
| 241 | 0 | 0,526 | 1 | | | 3,376 | 1 | 3,301 | 1 | 29,15 | 1 | 32,5 | 1 | | | | |
| 256 | 0 | 0,002 | 0 | | | 2,194 | 1 | 3,213 | 1 | 31,73 | 1 | 34,7 | inhibited | | | 33,17 | 1 |
| 260 | 0 | 0,876 | 1 | | | 3,426 | 1 | 3,267 | 1 | 27,59 | 1 | 29,97 | inhibited | | | 27,99 | 1 |
| 266 | 1 | 0,002 | 0 | 2,985 | 1 | 0,003 | 0 | 0,005 | 0 | 42,12 | 1 | - | 0 | 39,01 | 1 | 39,99 | 1 |
| 267 | 1 | 0,036 | 0 | 0,718 | 1 | 0,42 | 1 | 0,595 | 1 | 31,6 | 1 | - | 0 | 30,65 | 1 | 38,02 | 1 |
| 292 | 1 | 0,003 | 0 | 1,347 | 1 | 0,003 | 0 | 0,021 | 0 | - | 0 | - | 0 | | | | |
| 294 | 1 | 0,003 | 0 | 3,111 | 1 | 0,003 | 0 | 0,391 | 1 | 35,13 | 1 | 38,67 | 1 | | | | |
| 301 | 1 | 0,003 | 0 | | | 3,396 | 1 | 3,239 | 1 | 29,97 | 1 | 31,46 | 1 | | | | |

c) Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie

| | | | | | | | |
|-----------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tag 1, Lauf 1/2 | Replikate: | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | PosKo | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,410 | 3,600 | 3,439 |
| | NegKo | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| | R1 | 2,337 | 2,487 | 2,854 | 2,131 | 2,685 | 2,629 |
| | R2 | 1,506 | 1,351 | 1,591 | 1,53 | 1,5 | 1,436 |
| | R3 | 0,699 | 0,479 | 0,601 | 0,496 | 0,522 | 0,528 |
| | R4 | 0,683 | 0,682 | 0,493 | 0,672 | 0,533 | 0,501 |
| | R5 | 0,224 | 0,179 | 0,267 | 0,205 | 0,184 | 0,199 |
| | R6 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,002 |
| | | | | | | | |
| Tag 2, Lauf 3/4 | Replikate: | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | PosKo | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 |
| | NegKo | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,003 |
| | R1 | 2,223 | 2,528 | 2,677 | 1,964 | 2,309 | 2,413 |
| | R2 | 1,642 | 1,436 | 1,463 | 1,355 | 1,186 | 1,512 |
| | R3 | 0,866 | 0,508 | 0,469 | 0,722 | 0,406 | 0,403 |
| | R4 | 0,465 | 0,538 | 0,483 | 0,452 | 0,613 | 0,452 |
| | R5 | 0,143 | 0,154 | 0,216 | 0,152 | 0,149 | 0,183 |
| | R6 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| | | | | | | | |
| Tag 3, Lauf 5/6 | Replikate: | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | PosKo | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 |
| | NegKo | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 |
| | R1 | 1,954 | 2,181 | 2,801 | 2,028 | 2,132 | 2,656 |
| | R2 | 1,617 | 1,433 | 1,493 | 1,491 | 1,267 | 1,356 |
| | R3 | 0,785 | 0,47 | 0,513 | 0,757 | 0,48 | 0,403 |
| | R4 | 0,322 | 0,515 | 0,47 | 0,462 | 0,611 | 0,469 |
| | R5 | 0,142 | 0,14 | 0,227 | 0,182 | 0,187 | 0,206 |
| | R6 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,001 |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tag 4, Lauf 7/8 | Replikate: | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | PosKo | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 |
| | NegKo | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,002 |
| | R1 | 1,815 | 1,944 | 2,085 | 2,309 | 2,744 | 2,649 |
| | R2 | 1,107 | 1,118 | 1,183 | 1,324 | 1,269 | 1,458 |
| | R3 | 0,452 | 0,408 | 0,356 | 0,588 | 0,591 | 0,584 |
| | R4 | 0,383 | 0,486 | 0,321 | 0,566 | 0,549 | 0,35 |
| | R5 | 0,093 | 0,209 | 0,17 | 0,169 | 0,242 | 0,257 |
| | R6 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,017 | 0,002 |
| | | | | | | | |
| Tag 5; Lauf 9/10 | Replikate: | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | PosKo | 3,433 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 | 3,600 |
| | NegKo | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,003 |
| | R1 | 2,541 | 2,588 | 2,707 | 2,299 | 2,521 | 2,56 |
| | R2 | 1,679 | 1,635 | 1,665 | 1,446 | 1,28 | 1,577 |
| | R3 | 0,701 | 0,568 | 0,588 | 0,693 | 0,609 | 0,601 |
| | R4 | 0,616 | 0,669 | 0,557 | 0,437 | 0,595 | 0,582 |
| | R5 | 0,192 | 0,237 | 0,189 | 0,178 | 0,279 | 0,197 |
| | R6 | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| | | | | | | | |

d) Ergebnisse der Pilotchargen 1/2/3 des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH-ELISA

| Proben Nr. | Studie (homogenisierte Probe) | | | | | |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile GDH (R-Biopharm) 1. PILOTCHARGE | | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile GDH (R-Biopharm) 2. PILOTCHARGE | | Ergebnis RIDASCREEN Clostridium difficile GDH (R-Biopharm) 3. PILOTCHARGE | |
| | OD | | OD | | OD | |
| 1 | 3,394 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 7 | 2,706 | 1 | 3,435 | 1 | 3,6 | 1 |
| 9 | 0,646 | 1 | 0,828 | 1 | 0,706 | 1 |
| 19 | 3,6 | 1 | 3,38 | 1 | 3,359 | 1 |
| 27 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 32 | 3,388 | 1 | 3,38 | 1 | 3,6 | 1 |
| 36 | 3,6 | 1 | 3,318 | 1 | 3,6 | 1 |
| 43 | 3,6 | 1 | 3,35 | 1 | 3,3 | 1 |
| 54 | 3,6 | 1 | 3,377 | 1 | 3,335 | 1 |
| 55 | 3,6 | 1 | 3,43 | 1 | 3,421 | 1 |
| 56 | 1,019 | 1 | 3,353 | 1 | 3,364 | 1 |
| 63 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 67 | 3,6 | 1 | 3,409 | 1 | 3,6 | 1 |
| 70 | 3,6 | 1 | 3,409 | 1 | 3,6 | 1 |
| 72 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,417 | 1 |
| 76 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,405 | 1 |
| 88 | 3,6 | 1 | 3,388 | 1 | 3,336 | 1 |
| 95 | 1,228 | 1 | 1,951 | 1 | 1,005 | 1 |
| 102 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 107 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,41 | 1 |
| 108 | 3,432 | 1 | 3,6 | 1 | 3,361 | 1 |
| 109 | 0,006 | 0 | 3,6 | 1 | 3,429 | 1 |
| 116 | 3,438 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 117 | 3,6 | 1 | 3,379 | 1 | 3,388 | 1 |
| 120 | 3,6 | 1 | 3,419 | 1 | 3,6 | 1 |
| 121 | 3,6 | 1 | 3,444 | 1 | 3,418 | 1 |
| 124 | 3,6 | 1 | 3,433 | 1 | 3,6 | 1 |
| 126 | 0,094 | 1 | 0,3 | 1 | 0,216 | 1 |
| 128 | 3,6 | 1 | 3,435 | 1 | 3,6 | 1 |
| 130 | 3,6 | 1 | 3,4 | 1 | 3,411 | 1 |
| 137 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,444 | 1 |
| 138 | 3,418 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 146 | 3,6 | 1 | 3,426 | 1 | 3,428 | 1 |
| 152 | 0,032 | 0 | 0,224 | 1 | 0,206 | 1 |
| 162 | 3,342 | 1 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 |
| 168 | 3,6 | 1 | 3,185 | 1 | 3,177 | 1 |
| 170 | 3,451 | 1 | 3,366 | 1 | 3,247 | 1 |
| 174 | 3,6 | 1 | 3,312 | 1 | 3,6 | 1 |
| 175 | 1,628 | 1 | 2,491 | 1 | 1,639 | 1 |

| | | | | | | |
|-----|-------|---|-------|---|-------|---|
| 176 | 3,6 | 1 | 3,386 | 1 | 3,6 | 1 |
| 180 | 3,398 | 1 | 3,6 | 1 | 3,424 | 1 |
| 186 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,418 | 1 |
| 197 | 3,6 | 1 | 3,341 | 1 | 3,6 | 1 |
| 202 | 3,421 | 1 | 3,435 | 1 | 3,6 | 1 |
| 213 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,433 | 1 |
| 216 | 0,48 | 1 | 1,104 | 1 | 0,408 | 1 |
| 218 | 1,496 | 1 | 1,369 | 1 | 0,601 | 1 |
| 222 | 3,6 | 1 | 3,442 | 1 | 3,422 | 1 |
| 226 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,423 | 1 |
| 241 | 3,376 | 1 | 3,423 | 1 | 3,361 | 1 |
| 249 | 3,6 | 1 | 3,39 | 1 | 3,6 | 1 |
| 256 | 2,194 | 1 | 3,209 | 1 | 3,355 | 1 |
| 260 | 3,426 | 1 | 3,415 | 1 | 3,325 | 1 |
| 267 | 0,42 | 1 | 0,64 | 1 | 0,611 | 1 |
| 269 | 3,431 | 1 | 3,6 | 1 | 3,438 | 1 |
| 273 | 3,6 | 1 | 3,344 | 1 | 3,372 | 1 |
| 291 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,439 | 1 |
| 293 | 0,672 | 1 | 1,977 | 1 | 2,148 | 1 |
| 295 | 3,6 | 1 | 3,6 | 1 | 3,404 | 1 |
| 296 | 2,554 | 1 | 3,431 | 1 | 3,308 | 1 |
| 301 | 3,396 | 1 | 3,6 | 1 | 3,381 | 1 |

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 30.01.2013

Mareike Böhm